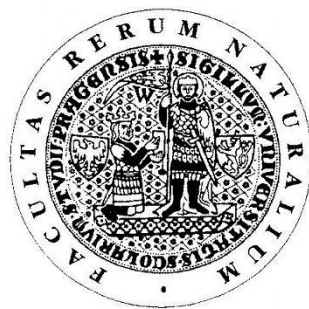


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza

Studijní obor: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Miroslava Kopecká

PŘÍPRAVA VAZEBNÝCH PARTNERŮ
14-3-3 PROTEINŮ PRO STRUKTURNÍ STUDIE

Preparation of the 14-3-3 Protein Binding Partners
for Structural Studies

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Tomáš Obšil, Ph.D.

Praha 2011

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze, 10. května 2011

Poděkování

Děkuji Doc. RNDr. Tomáši Obšilovi, Ph.D. za odborné vedení, jeho čas, trpělivost a množství rad, které mi při tvorbě diplomové práce poskytl.

Děkuji Mgr. Lence Řežábkové a RNDr. Veronice Obšilové, Ph.D. za pomoc a praktické rady týkající se práce v laboratoři.

Děkuji RNDr. Zdeňkovi Tošnerovi, Ph.D. za naměření NMR spekter a za informace týkající se NMR technik.

Děkuji RNDr. Miroslavu Štěpánkovi, Ph.D. za naměření a zpracování výsledků z dynamického rozptylu světla.

Děkuji Doc. RNDr. Jiřímu Bryndovi, CSc. a Mgr. Petrovi Pachlovi z ÚOCHB AV ČR za pomoc při měření dynamického rozptylu světla.

Děkuji ostatním studentům a pracovníkům naší laboratoře za vytvoření příjemných pracovních podmínek.

Děkuji svým rodičům a prarodičům za všestrannou podporu při mém dosavadním studiu.

Abstrakt

Tyrosinhydroxylasa patří do skupiny hydroxylas aromatických aminokyselin a katalyzuje počáteční krok biosyntézy katecholaminových neuropřenašečů. Tento enzym má homotetramerní strukturu a skládá se ze tří strukturních domén: N-koncové regulační domény, katalytické domény a C-koncové tetramerizační domény. Aktivita tyrosinhydroxylasy je regulována fosforylací a regulací na úrovni exprese. Fosforylace Ser-19 umožňuje navázání proteinu 14-3-3, které ovlivňuje strukturu regulační domény a chrání ji před její defosforylací a degradací. Struktura regulační domény je stále neznámá, proto jsme se rozhodli pro její objasnění pomocí technik nukleární magnetické rezonance. Byl optimalizován expresní a purifikační protokol regulační domény tyrosinhydroxylasy. Protein byl exprimován jako fúzní protein obsahující histidinovou kotvu na N-konci polypeptidového řetězce. Purifikace se skládala ze dvou kroků: z niklové chelatační chromatografie a gelové permeační chromatografie. Dynamický rozptyl světla a ^1H -NMR spektroskopie byly využity k ověření monodisperzity proteinu a jeho možného použití pro další experimenty.

Klíčová slova

Tyrosinhydroxylasa, regulace, exprese, purifikace, NMR

Klíčové předměty

Biofyzikální chemie, molekulární biologie, proteinová biochemie

Abstract

Tyrosine hydroxylase belongs to the group of hydroxylases of aromatic acids and catalyzes a key step in the biosynthesis of catecholamine neurotransmitters. The tyrosine hydroxylase possesses the homotetrameric structure and contains three structural domains: the N-terminal regulatory domain, the catalytic domain and the C-terminal tetramerization domain. The activity of tyrosine hydroxylase is regulated by phosphorylation and through the regulation of its expression. Phosphorylation at Ser-19 induces binding of the 14-3-3 protein, which affects the structure of the regulatory domain and protects it against both dephosphorylation and degradation. Since the structure of the regulatory domain is still unknown, we decided to perform its structural characterization using NMR techniques. First, the expression and purification protocol of the regulatory domain of tyrosine hydroxylase was optimized. The protein was expressed as a His-tag fusion protein and its purification is composed from two steps: the chelating chromatography and the size-exclusion chromatography. The dynamic light scattering and the ^1H nuclear magnetic resonance were used to verify its monodispersity, and hence its suitability for further experiments.

Keywords

Tyrosin hydroxylase, regulation, expression, purification, NMR

Subject headings

Biophysical chemistry, molecular biology, protein biochemistry

Obsah

Seznam zkratek	8
1 Úvod	11
2 Teoretická část	12
2.2 Tyrosinhydroxylasa	12
2.3 Struktura tyrosinhydroxylasy	13
2.3.1 Primární struktura	13
2.3.2 Terciární a kvarterní struktura	14
2.3.3 Přítomnost a funkce atomu železa v aktivním centru	15
2.4 Mechanismus katalýzy	16
2.4.1 Substrátová specifita	17
2.5 Regulace aktivity tyrosinhydroxylasy	18
2.5.1 Regulace fosforylací	18
2.5.2 Vliv katecholaminů na aktivitu tyrosinhydroxylasy	20
2.5.3 Význam proteinů 14-3-3 v regulaci tyrosinhydroxylasy	20
2.6 Využití NMR spektroskopie při studiu struktury proteinů	20
2.6.1 Studium nestrukturních proteinů pomocí NMR	21
2.6.2 Podmínky pro řešení struktury proteinů pomocí NMR	21
2.6.3 Atomová jádra využívaná v NMR proteinů:	22
2.6.4 Stručný popis řešení struktury proteinu NMR technikou	22
3 Cíl práce	24
4 Experimentální část	25
4.2 Použitý materiál	25
4.2.1 Použité chemikálie	25
4.2.2 Přístroje	26
4.2.3 Ostatní materiál	26
4.3 Pracovní postup	27
4.3.1 Exprese TH1R v bakteriích <i>E.coli</i>	27
4.3.2 Centrifugace a lyze buněk	28
4.3.3 Sonikace	29
4.3.4 Niklová chelatační chromatografie	29

4.3.5	Dialýza frakcí obsahujících protein	31
4.3.6	Zakoncentrování a filtrování	31
4.3.7	Gelová permeační chromatografie	32
4.3.8	UV-VIS spektrofotometrické stanovení koncentrace	32
4.3.9	Dynamický rozptyl světla	33
4.3.10	Nukleární magnetická rezonance	34
5	Výsledky	35
5.2	Expres a purifikace TH1R pro NMR měření	35
5.3	Optimalizace purifikačního protokolu	36
5.3.1	Změna podmínek sonikace	36
5.3.2	Další podmínky, přidavek detergentu a inhibitoru proteas	36
5.3.3	Optimalizace niklové chelatační chromatografie	37
5.4	Výsledky klíčových purifikací	38
5.4.1	Purifikace I	38
5.4.2	Purifikace II	40
5.4.3	Purifikace III	42
5.4.4	Purifikace IV	45
5.4.5	Purifikace V	48
5.4.6	Purifikace VI	50
5.5	Analýza stability proteinu	52
5.6	Biofyzikální charakterizace proteinu TH1R	53
5.6.1	Dynamický rozptyl světla	53
5.6.2	Nukleární magnetická rezonance	56
6	Diskuse	58
7	Závěr	61
8	Seznam citované literatury	62

Seznam zkratek

A	absorbance
$A(\tau_r)$	distribuční funkce relaxačních dob τ_r
AMP	adenosinmonofosfát
AV ČR	Akademie věd České republiky
BL21 (DE3)	kmen bakterií <i>E. coli</i>
c	molární koncentrace [mol dm^{-3}]
CaMKII	kalcium/kalmodulin-dependentní proteinkinasa II
cDNA	DNA vytvořená reverzní transkripcí buněčné mRNA
C-konec	konec proteinu obsahující skupinu COOH
COSY	korelační NMR spektroskopie (z anglického Correlation Spectroscopy)
DLS	dynamický rozptyl světla
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTT	1,4-dithiothreitol ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$; redukční činidlo)
DOPA	3,4-dihydroxyfenylanin
EC	klasifikace enzymů (z anglického Enzyme Comission)
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	etylendiamintetraoctová kyselina
ERK	extracelulárními signál-regulující kinasa
FNMT	fenyletanolamin-N-metyltransferasa
FPLC	kapalinová chromatografie pro separaci proteinů (z anglického fast protein liquid chromatography)
$g^{(2)}$	autokorelační funkce
Glu	kyselina glutamová
GMP	guanosinmonofosfát
h_0	viskozita rozpouštědla
His	histidin
His-Tag	motiv šesti po sobě jdoucích histidinů tzv. histidinová kotva
HNCA	NMR experiment; korelace mezi $^1\text{H}_i^{\text{N}} - ^{15}\text{N}_i - ^{13}\text{C}_i^{\alpha}$ a $^1\text{H}_i^{\text{N}} - ^{15}\text{N}_i - ^{13}\text{C}_{i-1}^{\alpha}$
HN(CO)CA	NMR experiment; korelace mezi $^1\text{H}_i^{\text{N}} - ^{15}\text{N}_i - ^{13}\text{C}_{i-1}^{\alpha}$

HSQC	hetronukleární korelované spektrum (z anglického heteronuclear single-quantum correlation)
I	intenzita rozptýleného světla
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
k_B	Boltzmannova konstanta [$1,381 \cdot 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$]
K_m	Michaelisova konstanta [mol dm^{-3}]
l	délka optické dráhy [cm]
LB	Luria a Bertani
MAP	mitogen aktivující protein (z anglického mitogen-activated protein)
MAPKAP	MAP-dependentní kinasu-aktivující proteinkinasa
MePH ₄	6-metyltetrahydropterin
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
n_0	index lomu
N-konec	konec proteinu obsahující skupinu NH ₂
NMR	nukleární magnetická rezonance
NOE	nukleární Overhauserův efekt
NP-40	detergent (z anglického nonyl phenoxypolyethoxyethanol)
ot./min	počet otáček za minutu
<i>p. a.</i>	k analytickým účelům (z latinského <i>pro analysi</i>)
PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu
PBS	fosfátový pufr obsahující NaCl a KCl
PDPK	prolin-dependentní proteinkinasa
pET-15b	označení typu plazmidu
PH ₄	tetrahydropterinový kofaktor
PKA	cyklická AMP-dependentní proteinkinasa
PKC	proteinkinasa C
PMSF	fenylmetylsulfonylfluorid
ppm	vyjádření pro jednu miliontinu z celku (z anglického parts per million)
PřF UK	Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy
R_H	střední hydrodynamický poloměr rozptylujících částic [nm]
RNA	ribonukleová kyselina

SDS	dodecylsíran sodný
Ser	serin
T	termodynamická teplota [K]
t	čas [s]
TBE	Tris/HCl, boritá kyselina, EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametyletylendiamin
TH	tyrosinhydroxylasa
TH1R	regulační doména tyrosinhydroxylasy izoformy 1
Thr	threonin
TRIS	tris-hydroxymetyl-aminometan
TROSY	transverse relaxation optimalization spectroscopy, metoda NMR
UK	Univerzita Karlova
ÚOCHB	Ústav organické chemie a biochemie AV ČR
UV/VIS	ultrafialová oblast/viditelná oblast (z anglického Ultraviolet/visible)
Val	valin
V_{\max}	maximální rychlost enzymově katalyzované reakce [$\text{mol dm}^{-3} \text{s}^{-1}$]
v/v	objem/objem
w/v	hmotnost/objem
β	faktor koherence
δ	chemický posun [ppm]
ε	molární absorpční koeficient [$\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$]
λ	vlnová délka [nm]
θ	úhel rozptylu světla
τ	délka časové prodlevy [s]

1 Úvod

Tyrosinhydroxylasa je velice důležitá pro správnou funkci lidského organismu. Tento enzym katalyzuje počáteční krok biosyntézy katecholaminových neuropřenašečů, jako jsou například adrenalin, noradrenalin nebo dopamin [1]. Nesprávná funkce nebo snížená aktivita tyrosinhydroxylasy může v organismu způsobit neurodegenerativní onemocnění. V dnešní době je věnována pozornost hlavně jejímu vlivu na vznik schizofrenie, Parkinsonovy choroby a souvislosti s výskytem depresí [2].

Regulační proteiny 14-3-3 představují rodinu konzervovaných eukaryotických bílkovin, které váží a regulují funkce svých vazebných partnerů. Jedním z nich je i tyrosinhydroxylasa [3]. Tyto proteiny se účastní mnoha biologických dějů, jako jsou např. regulace buněčného cyklu a metabolismu, přenos signálů v buňce či apoptóza [4].

Předkládaná diplomová práce je součástí výzkumného projektu zaměřeného na studium mechanismu regulace aktivity lidské tyrosinhydroxylasy. Tento projekt je řešen na Katedře fyzikální a makromolekulární chemie PřF UK pod vedením Doc. RNDr. Tomáše Obšila, Ph.D. Hlavní pozornost je věnována interakcím mezi regulační doménou tyrosinhydroxylasy (TH1R; izoforma 1) a proteinem 14-3-3. Nedílnými součástmi projektu je příprava a studium struktury TH1R. Vzhledem k nestrukturované povaze tohoto proteinu nelze ke studiu jeho struktury použít proteinovou krystalografii [5]. Jako alternativa se proto nabízejí metody nukleární magnetické rezonance. Tato měření vyžadují stabilní, monodisperzní a relativně velmi koncentrovaný roztok proteinu.

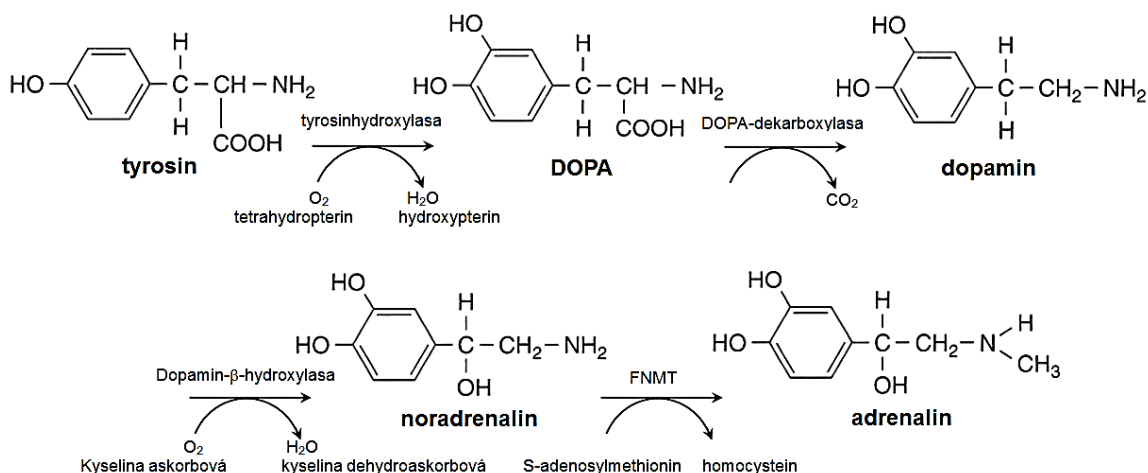
Tato diplomová práce navazuje na mou bakalářskou práci obhájenou v roce 2009 [6] a zabývá se dalším vývojem a optimalizací dříve navrženého purifikačního protokolu regulační domény lidské tyrosinhydroxylasy s cílem připravit miligramová množství čistého, monodisperzního a stabilního proteinu s možností izotopového obohacení.

2 Teoretická část

2.2 Tyrosinhydroxylasa

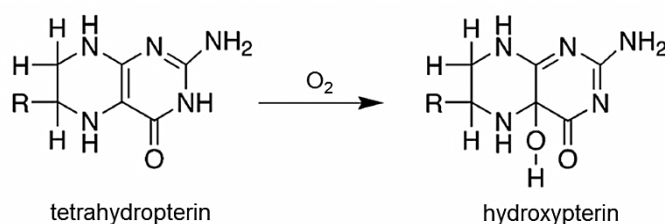
Enzym tyrosinhydroxylasa (EC 1.14.16.2) spolu s enzymy fenylalaninhydroxylasou a tryptofanhydroxylasou patří do nepočetné rodiny monooxygenas, které se řadí do třídy oxidoreduktas. Tyto enzymy vykazujících funkční a strukturní podobnosti a jako kofaktor pro katalýzu hydroxylace aromatického kruhu aminokyselin využívají tetrahydropterin. Enzym tyrosinhydroxylasa se nachází především v centrální a periferní nervové soustavě a v chromafinních buňkách dřeně nadledvin [1, 7]. Tyrosinhydroxylasa se v neuroendokrinních buňkách vyskytuje v rozpustné formě nebo je navázána na jejich membránu [1, 8]. Důležitost tyrosinhydroxylasy vyplývá z jejího vlivu na vznik neurodegenerativních onemocnění, jako jsou Parkinsonova choroba a Segawova nemoc [2, 9].

Tyrosinhydroxylasa má klíčovou a zároveň rychlost limitující úlohu v jedné z prvních reakcí biosyntézy katecholaminových neuropřenašečů, kterými jsou například dopamin, noradrenalin a adrenalin (viz obrázek 2.1) [1, 10].



Obrázek 2.1: Schéma biosyntézy katecholaminových neuropřenašečů. Vznik adrenalinu z tyrosinu probíhá během čtyř na sebe navazujících reakcí: hydroxylace aromatického kruhu tyrosinu katalyzovaná tyrosinhydroxylasou, dekarboxylace 3,4-dihydroxyfenylaninu (DOPA) pomocí DOPA-dekarboxylasy, hydroxylace postranního řetězce dopaminu dopamin-β-hydroxylasou a N-metylace noradrenalinu pomocí FNMT (fenyletanolamin-N-metyltransferasa). Převzato a upraveno podle [10].

Hlavní reakcí, kterou tyrosinhydroxylasa katalyzuje, je adice hydroxylové skupiny na tyrosin a vznik 3,4-dihydroxyfenylalaninu (DOPA) [11, 12]. Při této reakci dochází k zabudování jednoho atomu kyslíku z molekulárního kyslíku O_2 do substrátu a k redukci druhého atomu kyslíku na vodu. K této redukci jsou potřeba dva elektrony, které jsou dodány tetrahydropterinovým kofaktorem (PH_4). Pterinovým produktem této reakce je hydroxypterin viz obrázek 2.2 [13, 14].



Obrázek 2.2: Princip využití tetrahydropterinu jako kofaktoru tyrosinhydroxylasy. Převzato a upraveno podle [14].

2.3 Struktura tyrosinhydroxylasy

Tyrosinhydroxylasa eukaryotických buněk se skládá z homologní katalytické domény, na kterou jsou připojeny N-koncová regulační doména a krátká C-koncová tetramerizační doména [7].

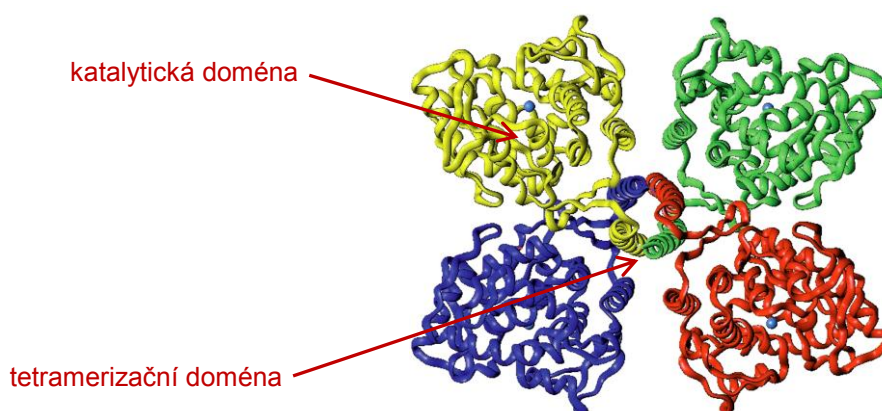
2.3.1 Primární struktura

Molekulu tyrosinhydroxylasy tvoří celkem 498 aminokyselinových zbytků [15, 16]. N-koncová oblast se u jednotlivých typů enzymů liší svou délkou i sekvencí, naproti tomu C-konec je vysoce konzervovaným úsekem, který se nachází přibližně v oblasti od aminokyseliny Val-164 [7]. C-koncová část je tedy homologní v celé rodině monooxygenas příbuzných s tyrosinhydroxylasou a reprezentuje katalytické jádro enzymu a tetramerizační doménu [16]. Existují čtyři různé formy lidské tyrosinhydroxylasy, které se od sebe vzájemně odlišují svými N-koncovými částmi [17].

2.3.2 Terciární a kvarterní struktura

Tyrosinhydroxylasa je homotetramer složený z identických podjednotek [18]. Odstranění aminokyselin z N-konce enzymu nemění jeho kvartérní strukturu [19], zatímco odstranění 20 až 43 aminokyselin z C-konce změní tetramerní strukturu enzymu na monomerní [20, 21]. Ačkoliv posledních dvacet pět C-koncových aminokyselin tyrosinhydroxylasy není v eukaryotických buňkách konzervováno, obsahují v každé sedmi-aminokyselinové sekvenci vždy na 1. a 4. pozici hydrofobní aminokyselinový zbytek. Právě těchto posledních dvacet pět aminokyselin vyvábí α -helix tetramerizační domény, kterou celkově tvoří posledních 40 až 50 aminokyselin C-konce tyrosinhydroxylasy [21, 7]. Bazální spojnici čtyř podjednotek tyrosinhydroxylasy (jádro tetrameru) tvoří čtyři antiparalelní „coiled-coil“ α -helixy dlouhé 4 nm (viz obrázek 2.3) [9].

Katalytická doména tyrosinhydroxylasy se skládá přibližně z 280 aminokyselin nacházejících se blízko C-konce, který obsahuje všechny aminokyselinové zbytky důležité pro katalýzu a substrátovou specifitu [9, 15, 16, 19]. Struktura katalytické a tetramerizační domény tyrosinhydroxylasy je uvedena na obrázku 2.3.



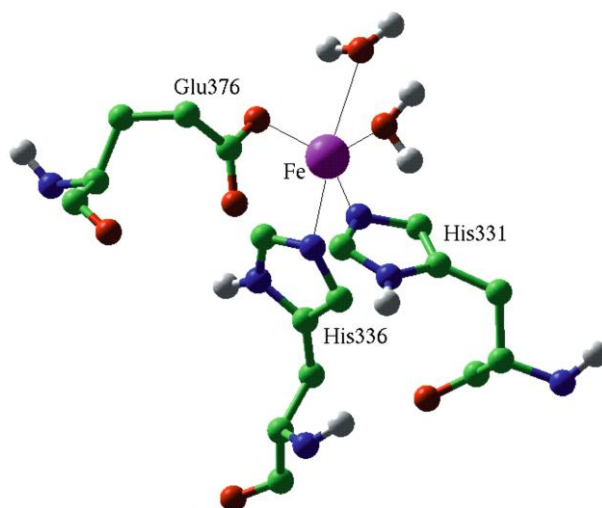
Obrázek 2.3: Tetramerní struktura tyrosinhydroxylasy – struktura katalytické a tetramerizační domény (struktura regulační domény není doposud objasněna). Každý monomer ve svém aktivním centru obsahuje atom železa (na obrázku označen modrou barvou ve středu každé podjednotky) [7].

Regulační doména lidské tyrosinhydroxylasy izoformy 1 (TH1R) je nestrukturní doména s nízkým zastoupením sekundární struktury, což bylo potvrzeno pomocí měření cirkulárního dichroismu [5]. Skládá se ze 177 zbytků aminokyselin a je možné ji

odstranit, aniž by byl pozorován významný pokles katalytické aktivity [19]. N-konec tyrosinhydroxylasy fyzicky zabraňuje přístupu do aktivního centra enzymu s nenavázaným substrátem [22].

2.3.3 Přítomnost a funkce atomu železa v aktivním centru

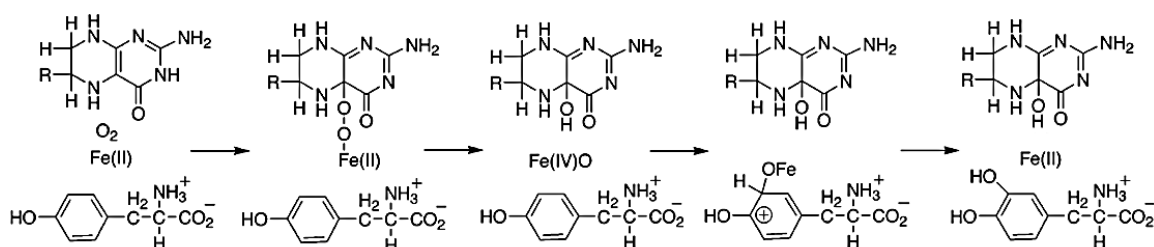
Tyrosinhydroxylasa je metaloprotein, který pro svou aktivitu potřebuje přítomnost jednoho atomu železa v každé ze svých čtyř podjednotek [23, 24]. Krystalová struktura katalytické a tetramerizační domény tyrosinhydroxylasy odhalila hydrofobní prostor, ve kterém se nachází atom železa a jehož povrch je tvořen čtyřmi α -helixy obsahujícími hlavně hydrofobní aminokyseliny. Atom železa leží 1 nm pod povrchem enzymu v jeho aktivním místě (v prostoru hlubokém 1,7 nm), kde je koordinován pomocí konzervovaných aminokyselinových zbytků His-331, His-336 a Glu-376, jak je vidět na obrázku 2.4 [9, 7]. Bylo prokázáno, že ve svém aktivním stavu tyrosinhydroxylasa obsahuje železo ve formě kationtu Fe^{2+} [25]. Kationt Fe^{2+} je ochotně oxidován molekulárním kyslíkem na kationt Fe^{3+} [26]. Tento kationt je pravděpodobně redukován tetrahydropterinem (PH_4), který je přirozeným fyziologickým reduktantem a redukuje tyrosinhydroxylasu *in vitro*. Tyrosinhydroxylasa patrně začíná i končí svůj katalytický cyklus ve stavu obsahujícím kationt Fe^{2+} [14].



Obrázek 2.4: Aminokyselinové zbytky His-331, His-336 a Glu-376 koordinující atom železa v aktivním místě enzymu [7].

2.4 Mechanismus katalýzy

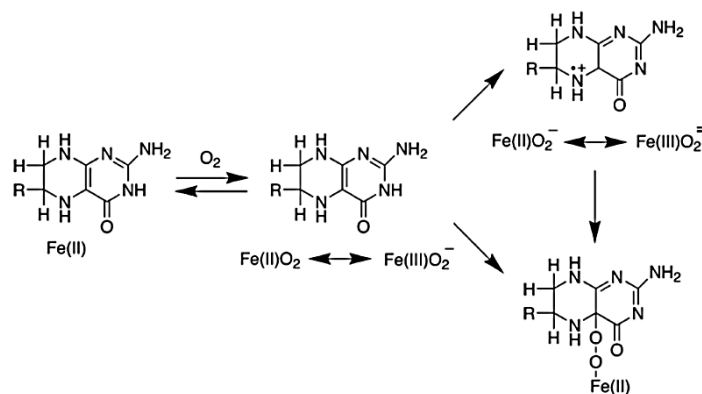
Všechny tři substráty enzymové reakce tyrosinhydroxylasy musejí být před samotnou katalýzou navázány v přesném pořadí. Jako první se na tyrosinhydroxylasu váže 6-metyltetrahydropterin (MePH₄), následně je navázán kyslík a jako poslední tyrosin. Při vysoké koncentraci tyrosinu dochází k substrátové inhibici [27]. Tyrosin musí být na tyrosinhydroxylasu navázán ještě před tím než dojde k reakci mezi kyslíkem a tetrahydropterinem. Mechanismus aktivace kyslíkem je znázorněn na obrázku 2.5. Hlavní reakci můžeme rozdělit na dvě dílčí reakce: na tvorbu hydroxylovaného intermediátu hydroxypterinu a na přenos kyslíku na aminokyselinový substrát [13, 14]. Zdrojem kyslíkového atomu pro pterinový produkt je molekulární kyslík [28], který je také zdrojem atomu kyslíku zabudovaného do tyrosinu [29].



Obrázek 2.5: Chemický mechanismus katalýzy tyrosinhydroxylasou – hydroxylace tyrosinu, vznik 3,4-dihydroxyfenylalaninu a přeměna pterinového kofaktoru tetrahydropterinu na hydroxypterin. Převzato a upraveno podle [14].

Skutečnost, že tyrosinhydroxylasa obsahuje atom železa ve svém aktivním centru, je v souladu s teorií předpokládající reakci mezi kyslíkem a tetrahydropterinem (viz obrázek 2.6 na straně 17). Předpokládá se totiž, že navázání atomu kyslíku na železo Fe(II) vytvoří komplex se strukturou analogickou ke komplexu Fe(III)O²⁻. Tento komplex pravděpodobně následně interaguje s pterinovým uhlíkem na pozici 4a za vzniku peroxypterinu. Takovýto mechanismus by se totiž vyhnul spinově-zakázané přímé reakci tripletového kyslíku s tetrahydropterinem.

Dalšími možnostmi je vazba kyslíku na železo v nevratné reakci zahrnující přenos elektronu z pterinu na kyslík a vznik komplexu Fe(II)O₂⁻ nebo nukleofilní vazba pterinu na železo vázající kyslík za vzniku Fe(II) peroxypterinu (viz obrázek 2.6 na straně 17) [14].



Obrázek 2.6: Předpokládaný mechanismus reakce mezi kyslíkem a tetrahydropterinem probíhající v aktivním centru enzymu. Převzato a upraveno podle [14].

Předpoklad, že iont železa je bezpodmínečně nutný pro mechanismus katalýzy reakce využívající tetrahydropterinový substrát, byl ověřován pomocí několika mutantních forem tyrosinhydroxylasy. U těchto mutantů byla snížena afinita ligandů k iontu železa. Z experimentů vyplynulo, že přítomnost železa v aktivním centru enzymu je zcela nezbytná pro průběh reakce [30]. Další teorie vysvětlující nutnost přítomnosti železa v aktivním centru enzymu je založena na skutečnosti, že železo je potřebné pro konformační změnu způsobenou vazbou tyrosinu a pterinu ještě před vlastní reakcí [14].

2.4.1 Substrátová specifita

Substrátovou (aminokyselinovou) specifitu tyrosinhydroxylasy je možné rozdělit na relativní specifitu pro tyrosin a specifitu pro další aminokyseliny, které mohou být hydroxylovány, jako je například fenylalanin [31]. Z homologie katalytických domén tyrosinhydroxylase příbuzných monooxygenas vyplývá, že její substrátovou specifitu ovlivňuje regulační doména [15]. Bylo prokázáno, že tyrosinhydroxylasa bez regulační domény vykazuje nižší specifitu pro tyrosin. Vliv regulační domény na substrátovou specifitu závisí na tvaru a flexibilitě aktivního místa. O absolutní substrátové specifitě rozhoduje struktura aktivního centra katalytické domény [32]. Pro tyrosin je hodnota V_{\max}/K_M desetkrát vyšší než pro fenylalanin a třicetkrát vyšší než pro tryptofan [33].

Přesné místo hydroxylace je určeno strukturou substrátu. V případě hydroxylace fenylalaninu tyrosinhydroxylasou nevzniká pouze tyrosin, ale i 3-hydroxyfenylalanin v poměru 25:1 [34].

Kofaktorová (pterinová) specifita tyrosinhydroxylasy spočívá v možnosti vázat tetrahydropterin s různými substituenty na pozici 6 v tetrahydropterinovém kruhu. Nejčastěji používaným substrátem je MePH₄ [35].

2.5 Regulace aktivity tyrosinhydroxylasy

Důležitost tyrosinhydroxylasy odráží složitost mechanismu, kterým je regulována její aktivita [12]. Kontrola regulace je prováděna několika různými mechanismy, které lze rozdělit na regulaci genové exprese (rychlost transkripce a stabilita mRNA), regulaci posttranslačními mechanismy (především fosforylací) [36] a na regulaci přímou. Za přímou regulaci aktivity tyrosinhydroxylasy se považuje zpětnovazebná inhibice katecholaminy, alosterická aktivace heparinem, fosfolipidy a RNA [7, 37].

2.5.1 Regulace fosforylací

Hlavním prostředkem regulace tyrosinhydroxylasy pomocí posttranslačních modifikací je reverzibilní fosforylace serinových zbytků regulační domény [7, 11, 38]. Vyhodnocení vlivu fosforylace na vlastnosti tyrosinhydroxylasy je komplikováno počtem možných fosforylačních míst [7]. Předpokládá se, že fosforylace umožňuje tyrosinhydroxylase přechod mezi aktivní a neaktivní formou beze změny mechanismu vazby substrátu nebo mechanismu katalýzy [14]. Regulační doména tyrosinhydroxylasy může být fosforylována několika různými proteinkinasami na Ser-8, Ser-19, Ser-31 a Ser-40 *in vitro* a *in vivo* [38, 39, 40, 41].

Fosforylace Ser-40 cyklickou AMP-dependentní proteinkinasou (PKA) způsobuje neúčinnější aktivaci tyrosinhydroxylasy [39, 42, 43, 44, 45]. Předpokládá se, že fosforylace Ser-40 mění konformaci regulační domény a její interakci s katalytickou doménou. Fosforylace Ser-40 ve svém okolí zvyšuje citlivost k proteolýze, což patrně potvrzuje souvislost mezi změnou konformace regulační domény a enzymovou aktivitou [46]. Hydroxylová skupina aminokyseliny Ser-40 pravděpodobně přispívá

ke stabilizaci komplexu enzymu s navázaným produktem reakce (katecholaminový neurotransmitter) a tím enzym inhibuje [42]. Fosforylace Ser-40 znemožňuje interakci (vodíkovou vazbu) mezi hydroxylovou skupinou Ser-40 a katecholaminem a tím usnadňuje disociaci produktu reakce, což vede k aktivaci enzymu [45, 47, 48, 49]. Hlavním efektem fosforylace je tedy uvolnění navázaného produktu reakce, spíše než jednoduché zvýšení rychlosti katalýzy [7]. Další serin/threonin kinasy, které fosforylují Ser-40 jsou: proteinkinasa C (PKC), kalcium/kalmodulin-dependentní proteinkinasa II (CaMKII), GMP-dependentní proteinkinasa a MAP kinasu-aktivující proteinkinasy 1 a 2 (MAPKAP kinasy) [39, 50]. PKA fosforyluje všechny podjednotky tyrosin hydroxylasy v rámci tetrameru, naproti tomu PKC a CaMKII fosforylují Ser-40 jen dvou podjednotek [51]. Bylo prokázáno, že fosforylace Ser-40 pouze dvou ze čtyř podjednotek pomocí PKC a CaMKII nezpůsobuje aktivaci enzymu [52].

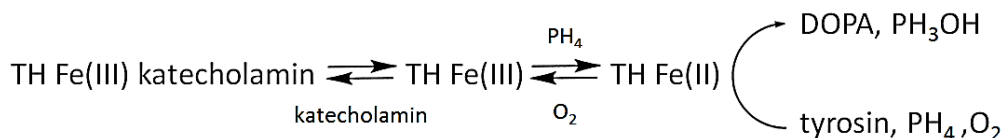
Ser-19 může být fosforylován CaMKII [39, 53], MAP kinasou a MAP kinasu-aktivujícími proteinkinasy 1 a 2 [50]. CaMKII fosforyluje Ser-19 všech podjednotek tetrameru [51]. Fosforylace Ser-19 sama o sobě nezpůsobuje přímé zvýšení aktivity enzymu, ale umožňuje navázání proteinu 14-3-3 na regulační doménu tyrosinhydroxylasy. Navázání proteinu 14-3-3 na fosforylovanou TH1R způsobuje prokazatelné strukturní změny této domény a chrání její N-koncovou část před proteolýzou a defosforylací [5]. Tímto způsobem má důležitý vliv na aktivitu enzymu.

Pro regulaci tyrosinhydroxylasy je také důležitá fosforylace Ser-31. Změny v sekvenci bezprostředně předcházející této aminokyselině pravděpodobně ovlivňují její rozeznávání specifickými proteinkinasy [12]. V lidských izoformách může být Ser-31 fosforylován CaM-PKII a MAP kinasami ERK 1 a ERK 2 (extracelulárními signál-regulujícími kinasami 1 a 2) [50, 54].

Čtvrtým fosforylačním místem je Ser-8, který je možné fosforylovat prolin-dependentní proteinkinase (PDPK). Lidská tyrosinhydroxylasa má na pozici 8 threonin [12].

2.5.2 Vliv katecholaminů na aktivitu tyrosinhydroxylasy

Vysoká stabilita komplexu enzym-katecholamin inhibuje aktivitu tyrosinhydroxylasy znemožňuje vazbu jak pterinového kofaktoru PH_4 [55], tak i substrátu. Nepřítomnost PH_4 znemožňuje redukci kationtu Fe^{3+} na Fe^{2+} , který je nezbytný pro aktivaci enzymu [26, 56]. Vliv katecholaminů na aktivitu tyrosinhydroxylasy je zobrazen na obrázku 2.7.



Obrázek 2.7: Regulační mechanismus tyrosinhydroxylasy (TH) prostřednictvím vazby katecholaminu. Převzato a upraveno podle [7].

2.5.3 Význam proteinů 14-3-3 v regulaci tyrosinhydroxylasy

Proteiny 14-3-3 byly identifikovány jako proteiny aktivující tyrosinhydroxylasu [3]. Je to rodina vysoce konzervovaných proteinů nacházejících, které se účastní přenosu signálu v mnoha různých signálních drahách [4, 57]. Tyto proteiny rozpoznávají specifické motivy obsahující fosforylovaný serin (pS) nebo fosforylovaný threonin (pT) [58]. V regulační doméně tyrosinhydroxylasy se nacházejí dva takovéto vazebné motivy v okolí Ser-19 a Ser-40 [5]. Fosforylace Ser-19 tak umožňuje vazbu proteinu 14-3-3, která způsobuje zvýšení aktivity tyrosinhydroxylasy [59]. Navýšení aktivity patrně spočívá ve stabilizaci struktury fosforylované regulační domény a její ochrany před proteolytickou degradací a defosforylací (fosforylace Ser-40 je nutná pro odstranění inhibice katecholaminy) [60, 61, 62].

2.6 Využití NMR spektroskopie při studiu struktury proteinů

Obecně se proteiny vyznačují rozmanitým složením a velice variabilní trojrozměrnou strukturou, což jim umožňuje zastávat velké množství funkcí od katalytické aktivity přes stavební funkce po regulaci a přenos signálů v buňce. Struktura proteinů je rozdělována na primární, sekundární, terciární a kvartérní. NMR v roztocích umožňuje řešení právě terciární a kvartérní struktury proteinu s atomovým rozlišením [63].

2.6.1 Studium nestrukturních proteinů pomocí NMR

Nestrukturované a částečně strukturované proteiny je obvykle velmi obtížné ne-li zcela nemožné vykrytalizovat. Pokud krystaly vzniknou, řetězce segmentů, které jsou v roztoku nestrukturované, mohou být uspořádány díky intermolekulárním kontaktům krystalové mřížky nebo nejsou vůbec identifikovatelné pomocí difrakčních metod [63, 64]. Nestrukturované proteiny hrají velice významnou roli ve velkém množství buněčných procesů a NMR je zatím jednou z mála metod umožňující studium jejich konformací [65].

Řešení trojrozměrné struktury proteinu metodou NMR je jedinečné zejména díky možnosti měření v roztocích napodobujících fyziologické podmínky. Znalost molekulární struktury proteinu v roztoku je velice významná, protože přirozeným prostředím, ve kterém se proteiny vyskytují, jsou tělní tekutiny jako např. krev, žaludeční šťávy nebo sliny. NMR měření tak poskytuje možnosti úpravy pH, koncentrace soli a teploty, tak aby co nejvíce odpovídaly fyziologickému prostředí [63].

Jednou z velkých výhod moderní NMR spektroskopie proteinů je její vysoce selektivní odezva a snížená potřeba množství studovaného proteinu. To vše díky vyšším magnetickým polím (až 900 MHz vodíková frekvence), použití kryosond, TROSY (transverse relaxation optimalization spectroscopy), reziduálnímu dipolárnímu spřáhnutí či izotopovému značení. Naproti tomu nevýhodou je omezení velikostí měřených molekul [64].

2.6.2 Podmínky pro řešení struktury proteinů pomocí NMR

Strukturu proteinů do relativní molekulové váhy 10 000 (méně než 70 aminokyselin) lze řešit přímo. Pro řešení struktury proteinů s relativní molekulovou hmotností do 30 000 (méně než 210 aminokyselin) je nutné 100% izotopové obohacení pomocí ^{13}C a ^{15}N . To potřebují také proteiny s relativní molekulovou hmotností do 100 000, které je navíc ještě nutné částečně nebo úplně obohatit izotopem vodíku ^2H . U řešení struktury větších proteinů je možné pouze hrubé orientační určení celkové struktury [64, 66].

Koncentrace měřeného vzorku musí dosahovat hodnoty $0,1 \cdot 10^{-3}$ až 1 mol dm^{-3} a objem musí být 250 – 500 μl . Další podmínkou je dlouhodobá stabilita vzorku (až několik týdnů) [64].

Expres 100% izotopově značených proteinů se provádí buď v minimálních médiích, kde je jediným zdrojem dusíku $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ nebo $^{15}\text{NH}_4\text{SO}_4$ a jediným zdrojem uhlíku ^{13}C -glukosa nebo ^{13}C -glycerol. Je možné také zakoupit izotopově obohacené růstové médium, jehož výroba je podstatně náročnější [67, 68].

2.6.3 Atomová jádra využívaná v NMR proteinů:

Vodíkové jádro ^1H se vyznačuje vysokým přirozeným zastoupením (99,99 %) a vysokou citlivostí, ale disperze chemických posunů je příliš malá (přibližně 15 ppm). Jádro uhlíku ^{13}C má disperzi chemických posunů poměrně velkou (přibližně 210 ppm), naproti tomu ale nízké přirozené zastoupení 1,07 % a nízkou citlivost. Dalším měřeným jádrem je dusíkové jádro ^{15}N , které se vyznačuje střední disperzí chemických posunů (přibližně 30 ppm), nízkým přirozeným zastoupením (0,37 %) a také nízkou citlivostí. Nízké citlivosti jader ^{13}C a ^{15}N lze navýšit pomocí 100% izotopového obohacení. Jádra ^2H jsou využívána pouze pro speciální účely [63, 64].

2.6.4 Stručný popis řešení struktury proteinu NMR technikou

Postup řešení struktury proteinu NMR technikou se skládá z několika kroků. Nejdříve je nutné připravit izotopově značený, dostatečně čistý a stabilní vzorek proteinu měřitelné koncentrace. Následuje naměření NMR spektra pomocí NMR spektrometru s vodíkovou frekvencí 500 – 900 MHz a přiřazování signálů. Poté je proveden výpočet souboru přibližných struktur z obecně známých informací o molekule a z přiřazených NMR parametrů. Následuje vyhodnocení kvality struktur, případná oprava přiřazení a nový výpočet souboru struktur, statistické vyhodnocení a porovnání s databázemi [64].

Jednou z nutných podmínek úspěšného naměření spektra je potlačení signálu vody, který je asi $10^4\times - 10^5\times$ intenzivnější než signál měřeného proteinu. Není možné H_2O nahradit D_2O , protože by docházelo k výměně s amidickými vodíky proteinu. Často používaná je metoda watergate skládající se z gradientního echa se selektivním 180° pulsem, který působí na všechny vodíky, kromě vodíků vody.

Základní jednodimensionální ^1H -NMR spektrum umožňuje pouze odhad monodisperzity a případně určení zda se jedná o strukturní nebo nestrukturní proteinovou formu. Toto spektrum se vyznačuje velkým počtem překryvů jednotlivých signálů, proto je nutné tyto informace rozdělit pomocí dvoudimensionálních [69] a vícedimensionálních spekter. Z tohoto důvodu jsou ^1H spektra využívána spíše pro kontrolu správného sbalení proteinu, jeho dostatečné koncentrace a pro sledování dlouhodobé stability.

$^1\text{H} - ^{15}\text{N}$ HSQC spektrum (hetronukleární korelované spektrum; heteronukleární single-quantum correlation) získané z ^{15}N značeného proteinového vzorku je možné využít pro ověření terciální struktury proteinu, rozlišení mezi sbalenou a nesbalenou formou, pro kontrolu čistoty proteinu, pro sledování lokálních strukturních změn a interakcí.

K objasnění celkové proteinové struktury je nutné použít vícedimensionální NMR experimenty a 100% izotopové obohacení vzorku. K přiřazení jednotlivých signálů je potřeba znát přesnou sekvenci a typ aminokyselin v biomakromolekule. Nejdříve jsou přiřazovány signály hlavního řetězce (^1H , ^{15}N a ^{13}C ; trojrezonanční experimenty HNCA a HN(CO)CA aj.) následovány přiřazováním signálů řetězců postranních (TOCSY a COSY experimenty).

Strukturní omezení nutná pro výpočet trojrozměrné struktury proteinu vyplývají z následujících NMR parametrů. Pro přiřazení meziatomé vzdálenosti se využívá NOE (Nukleární Overhauserův efekt), pro dihedrální úhly pak skalární interakční konstanta, pro určení chemického okolí chemický posun, pro vzájemnou orientaci vazeb reziduální dipolární spřáhnutí a pro detailní lokální strukturu výsledky vyplývající z přítomnosti vodíkových vazeb.

3 Cíl práce

Hlavním cílem této diplomové práce byl další vývoj a optimalizace již dříve navrženého purifikačního protokolu regulační domény lidské tyrosinhydroxylasy (TH1R; izoforma 1) pro strukturní studie pomocí nukleární magnetické rezonance.

Dílčí cíle diplomové práce:

- Optimalizace existujícího expresního a purifikačního protokolu pro lidskou TH1R.
- Exprese regulační domény lidské tyrosinhydroxylasy v bakteriích *Escherichia coli* kmen BL21 (DE3) na minimálním médiu umožňující izotopové obohacení.
- Studium monodisperzity připraveného proteinu pomocí dynamického rozptylu světla a jednodimenzionálních ^1H -NMR spekter.

4 Experimentální část

4.2 Použitý materiál

4.2.1 Použité chemikálie

agar – Carl Roth GmbH, Německo

agarosa – Carl Roth GmbH, Německo

akrylamid – Carl Roth GmbH, Německo

ampicilin – Sigma, USA

bacto trypton (pepton) – Carl Roth GmbH, Německo

bacto yeast extract (kvasniční extrakt) – Carl Roth GmbH, Německo

běžné chemikálie – Lachema a.s., ČR

bis-akryamid – Carl Roth GmbH, Německo

bromfenolová modř – Sigma, USA

Coomassie Brilliant Blue R-250 – Lachema a.s., ČR

deuterovaná voda – Sigma, USA

DTT (dithiothreitol) – Carl Roth GmbH, Německo

EDTA – Sigma, USA

glycin – Carl Roth GmbH, Německo

imidazol – Carl Roth GmbH, Německo

IPTG – Sigma, USA

izopropanol – Lachema a.s., ČR

lysozym – New England BioLabs, USA

NP-40 – 70% roztok ve vodě, Sigma, USA

persíran amonný – Sigma, USA

SDS – Sigma, USA

síran nikelnatý – Penta, ČR

TEMED – Carl Roth GmbH, Německo

TRIS – Carl Roth GmbH, Německo

β -merkptoetanol – Carl Roth GmbH, Německo

Všechny chemikálie byly nejméně čistoty *p.a.*

4.2.2 Přístroje

centrifuga – centrifugace bakteriálních kultur – K80, MLW, Německo
centrifuga – centrifugace sonikátu – Hermle Z 323 K, Německo
centrifuga – pro mikrozkušky – MPW 52, Polsko
centrifuga – zakoncentrovávání proteinů – Eppendorf 5804R, Německo
DLS analyzátor – ALV, Langen, Německo
DLS analyzátor – Laser-Spectroscatter 201 RiNA GmbH Netzwerk
RNA-Technologien, Německo
chromatografie – FPLC-AKTA, Amersham Biosciences, Švédsko
NMR spektrometr – 600MHz, Bruker Avance III, Německo
pH-metr – 3505 pH Meter, Jenway, P-LAB, Velká Británie
sonikátor – Ultrasonic Processor, Cole Farmer, USA
spektrofotometr – Cecil Instrument, 8000 Series, Velká Británie
třepačka – Infors HT Multitron II, Švýcarsko
třepačka – Handy LAB[®] System, N-BIOTEK, NB-205, Korea
UV-Vis absorpční spektrofotometr – Agilent 8453, USA

4.2.3 Ostatní materiál

centrifugační filtr – 10 000 MWC, 1 500 µl, Amicon Ultra, Millipore, USA
dialyzační membrána – MCO (Molecular weight cut off) 14000 – C. Roth, Německo
E. coli kmen BL21 (DE3) – Stratagene, USA
E. coli kmen JM109 (DH5α) – Stratagene, USA
inhibitor proteas – Protease Inhibitor Cocktail Tablet, Sigma, USA
jednorázový filtr – SPARTAN 13/0,45RC – Whatman, Německo
jetquick Plazmid Miniprep spin kit – Genomed, USA
kolona Superdex[™] 200 10/100 GL Tricorn, Amersham Biosciences, Švédsko
sepharosa – Chelating Sepharose[™] Fast Flow, Amersham Biosciences, Švédsko
standard molekulových vah proteinů – Precision Plus Protein Dual Color Standard,
Biorad, USA
vektor pET-15b – Invitrogen, USA

4.3 Pracovní postup

4.3.1 Exprese TH1R v bakteriích *E.coli*

Příprava a izolace plazmidové DNA a transformace plazmidu do buněk odpovídala přípravě popsané v mé bakalářské práci [6]. Narostlé kolonie buněk byly pomocí vysterylizovaného platinového drátku s kličkou přeneseny do zkumavek s pěti mililitry tekutého Luria-Bertani média (LB média; složení viz tabulka 4.1) obsahujícího ampicilin. Výsledná koncentrace antibiotika v médiích byla $100 \mu\text{g ml}^{-1}$. Následovala inkubace probíhající přes noc při 37°C a 200 ot./min.

Tabulka 4.1: Složení jednoho litru tekutého LB média.

LB médium 1 l	trypton	10 g
	kvasničný extrakt	5 g
	NaCl	10 g
	H ₂ O	doplnění do 1 l

Kultivace bakteriálních kultur určených k expresi proteinu TH1R byla provedena v dvoulitrových Erlenmeyerových baňkách obsahujících jeden litr sterilního LB média s přídavkem ampicilinu o výsledné koncentraci $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ nebo v jednom litru sterilního minimálního média se stejným obsahem ampicilinu. Při kultivaci na klasickém LB médiu bylo do každého jednoho litru média přidáno 5 ml bakteriální kultury z předchozího kroku. V případě kultivace na minimálním médiu (složení viz tabulka 4.2) bylo do jednoho litru tohoto média přidáno 10 ml bakteriální kultury. Tyto bakterie bylo předem nutné opláchnout od původního LB média pomocí tří centrifugací (4500 ot./min., 4°C , 3 min) a trojitého promytí pěti mililitry minimálního média.

Tabulka 4.2: Složení jednoho litru tekutého minimálního média.

Složky přidané před sterilizací	Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	15,1 g
	KH ₂ PO ₄	3 g
	NaCl	0,5 g
	NH ₄ Cl	1 g
	H ₂ O	doplnění do 1 l
Složky přidané do sterilního média	MgSO ₄ (1 mol dm^{-3})	2 ml
	CaCl ₂ (1 mol dm^{-3})	0,1 ml
	glukosa	4 g
	thiaminhydrochlorid (1 mol dm^{-3})	1 ml

Inkubace bakteriálních kultur v jednolitrových médiích probíhala nejdříve při teplotě 37 °C, při 200 ot./min. Kultivace probíhala do té doby, než průběžně proměřovaná optická denzita roztoků bakteriálních kultur dosáhla hodnoty 0,6 (měřeno proti blanku použitého média při vlnové délce 600 nm). Následovala indukce exprese proteinu TH1R pomocí 2,5 ml IPTG (isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid), jehož výsledná koncentrace byla $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$. Expres probíhala 12 h při teplotě 20 °C a 200 ot./min.

4.3.2 Centrifugace a lyze buněk

Bakteriální kultury byly přelity do jednolitrových kyvet a následně centrifugovány po dobu 20 min za teploty 4 °C při 3 400 ot./min. Po centrifugaci byly kyvety umístěny do nádoby s ledem, protože od této chvíle bylo nutné roztok buněk a později roztok proteinu TH1R chladit. Vzniklý supernatant obsahující médium byl odstraněn. Pelety obsahující bakterie byly resuspendovány v lyzačním pufru (složení viz tabulka 4.3). Na resuspendaci pelet vzniklých centrifugací tří litrů bakteriální bylo potřeba 100 ml tohoto pufru (případně 200 ml při resuspendaci buněk získaných z šesti litrů bakteriální kultury). Před sonikací byl roztok resuspendovaných buněk přelit do skleněné tlustostěnné kádinky a bylo k němu přidáno 5 mg lysozymu (výsledná koncentrace $100 \mu\text{g ml}^{-1}$). Následovala 45 minutová inkubace při teplotě 4 °C za stálého míchání.

Tabulka 4.3: Složení 100 ml lyzačního pufru a 1 l 10 \times koncentrovaného PBS pufru.

	Chemikálie	Výsledná koncentrace
Lyzační pufr 100 ml	H ₂ O	
	10 \times PBS	1 \times PBS
	NaCl	1 mol dm^{-3}
	imidazol	$2 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$
	PMSF (0,1 mol dm ⁻³)	$1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$
	NP-40 20% (v/v)	0,01 % (v/v)
10 \times PBS pufr 1 l pH = 7,3	NaCl	$1,44 \text{ mol dm}^{-3}$
	KCl	$27 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$
	Na ₂ HPO ₄	$50 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$
	KH ₂ PO ₄	$18 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$
	H ₂ O	

4.3.3 Sonikace

Před sonikací bylo nutné sondu sonikátoru očistit pomocí etanolu a vody a konec sondy umístit přibližně jeden centimetr ode dna kádinky s roztokem lyzovaných buněk. Celkový čas sonikování byl nastaven na 10 min. Ultrazvuk byl vždy po 3 s vypnut a následovala pauza dlouhá 17 s. Na konci sonikace roztok změnil svou konzistenci a získal našedlou barvu. Po celou dobu je nutné roztok chladit v lázni s ledem.

Následně byl roztok rozbitých buněk 40 min centrifugován při 13 500 ot./min a teplotě 4 °C. Výsledný supernatant (dále sonikát) byl uchován pro další zpracování a peleta byla odstraněna.

4.3.4 Niklová chelatační chromatografie

Plastová kolona pro niklovou chelatační chromatografii byla připojena k peristaltické pumpě a naplněna přibližně 5 ml sepharosy (Chelating SepharoseTM Fast Flow; 20% (v/v) etanol). Průtoková rychlost byla nastavena na 5 ml min⁻¹ a kolona byla postupně promývána následujícími roztoky:

- 15 ml destilovaná voda
- 15 ml roztok Stripp (0,5 mol dm⁻³ NaCl, 50 · 10⁻³ mol dm⁻³ EDTA)
- 20 ml destilovaná voda
- 50 ml 0,1 mol dm⁻³ NiSO₄
- 15 ml destilovaná voda
- 20 ml pufr E (složení viz tabulka 4.4 strana 30)

Když hladina pufru E dosáhla k rozhraní náplně kolony, byla peristaltická pumpa zastavena a vývod kolony uzavřen víčkem. Pomocí Pasteurovy pipety bylo do kolony přidáno přibližně 10 ml sonikátu a promícháno s náplní. Celý obsah kolony byl pomocí Pasteurovy pipety přemístěn do 200ml skleněné kádinky s roztokem sonikátu a za stálého míchání inkubován 30 min při teplotě 4 °C.

Poté byl obsah kádinky postupně centrifugován ve dvou 45ml pastových zkumavkách s víčkem při teplotě 4 °C a 1600 ot./min. po dobu jedné minuty. Díky tomu došlo k oddělení sepharosy s navázanými proteiny od supernatantu, který obsahoval nečistoty rozpuštěné v lyzačním pufru a který byl následně odstraněn.

Pro oddělení slaběji nespecificky navázaných bílkovin byl roztok postupně promýván celkem 300 ml 10% (v/v) roztoku pufru F v pufru E (složení viz tabulka 4.4). Po každém promytí opět následovala jednodominutová centrifugace při 1600 ot./min. a teplotě 4 °C. Posledních 100 ml 10% (v/v) pufru F bylo použito na přemístění náplně s navázaným proteinem zpět do kolony. Náplň s navázaným proteinem musela být neustále chlazená. Po promytí 10% (v/v) roztokem pufru F v pufru E byla peristaltická pumpa zastavena a vývod kolony uzavřen víčkem.

Eluce proteinu byla provedena pomocí pufru F (složení viz tabulka 4.4), který obsahoval imidazol o výsledné koncentraci 0,6 mol dm⁻³. Jednotlivé frakce byly postupně sbírány do deseti plastových mikrozku mávek umístěných ve stojánku v lázni s ledem.

Získané proteinové frakce byly analyzovány pomocí elektroforézy na 15% (v/v) polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsiranu sodného (SDS-PAGE). Popis celého procesu, příprava gelu, používaných pufrů, barvicího a odbarvovacího roztoku byla popsána v mé bakalářské práci [6]. Vždy bylo použito 12 µl proteinového standardu (Precision Plus Protein Dual Color Standard). Z jednotlivých frakcí získaných niklovou chelatační chromatografií byly odebrány 15µl vzorky a k nim přidáno 5 µl vzorkovacího pufru. 20µl roztoky vzorků byly před nanesením na gel zahřívány v plastových mikrozku mávkách 2 až 10 minut při teplotě 100 °C. Elektroforéza probíhala za stálého napětí 200 V.

Tabulka 4.4: Složení jednoho litru pufru E a jednoho litru pufru F.

	Chemikálie	Výsledná koncentrace
Pufr E 1 l	10× PBS	1× PBS
	NaCl	0,5 mol dm ⁻³
	imidazol	1 · 10 ⁻³ mol dm ⁻³
	20% (v/v) NP-40	0,01% (v/v) NP-40
	H ₂ O	
Pufr F 1 l pH = 8	10× PBS	1× PBS
	NaCl	0,5 mol dm ⁻³
	imidazol	0,6 mol dm ⁻³
	20% (v/v) NP-40	0,01% (v/v) NP-40
	100% (v/v) glycerol	10% (v/v) glycerol
	H ₂ O	

4.3.5 Dialýza frakcí obsahujících protein

Podle výsledků získaných SDS-PAGE byly vybrané frakce obsahující největší podíl požadovaného proteinu sloučeny dohromady a umístěny do dialyzační membrány uzavřené na obou koncích pomocí plastových svorek. Membrána byla vložena do předem připraveného dialyzačního pufru (složení viz tabulka 4.5), jehož objem byl jeden litr. Póry v membráně propouštějí molekuly do relativní molekulové hmotnosti 14 000. Dialýza probíhala za stálého míchání při teplotě 4 °C po dobu dvanácti hodin.

Tabulka 4.5: Složení jednoho litru dialyzačního pufru a jednoho litru fosfátového pufru, jehož molární koncentrace byla $20 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$.

	Chemikálie	Výsledná koncentrace
Dialyzační pufr 1 l	TRIS (pH 7,5)	$20 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$
	NaCl	$0,5 \text{ mol dm}^{-3}$
	EDTA	$1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$
	20% NP-40	0,01% NP-40
	H ₂ O	
Fosfátový pufr pH = 7 1 l	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	$11,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$
	Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	$8,7 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$
	NaCl	$0,3 \text{ mol dm}^{-3}$
	H ₂ O	

4.3.6 Zakoncentrování a filtrování

Roztok proteinu byl z dialyzační membrány přemístěn do 15ml plastové zkumavky pomocí 1ml automatické pipety a následnou centrifugací byly odstraněny vysrážené proteiny. Centrifugace probíhala 1 min při 1 600 ot./min a teplotě 4 °C. Vzniklý supernatant byl opatrně přenesen do koncentrátoru (Amicon Ultra, 10 000 MWCO, 1500 µl), jehož póry propouští molekuly s relativní molekulovou hmotností menší než 10 000. Zakoncentrování roztoku proteinu probíhalo při 3 000 ot./min, teplotě 4 °C. Výsledný roztok proteinu byl nakonec přefiltrován pomocí 0,45µm filtru (Spartan 13/0,45 RC; Whatman).

4.3.7 Gelová permeační chromatografie

Posledními kroky celého purifikačního procesu byly dvě za sebou jdoucí gelové permeační chromatografie. V první z nich byl jako mobilní fáze použit přefiltrovaný dialyzační pufr (složení viz tabulka 4.5 na straně 31) a ve druhé fosfátový pufr o pH = 7 (složení viz tabulka 4.5 na straně 31).

Po promytí FPLC přístroje pro gelovou permeační chromatografii pomocí přefiltrované a destilované vody a odvodušnění pump, byla za průtoku 0,5 ml min⁻¹ připojena kolona SuperdexTM 200 (10/300 GL) a promyta nejdříve destilovanou vodou a poté pufr, který byl použit jako mobilní fáze. Pomocí 2ml injekční stříkačky s jehlou byl přefiltrovaný roztok proteinu umístěn do dávkovací smyčky přístroje a spuštěn program pro automatické sbírání jednotlivých frakcí. Separace probíhala za průtoku 0,5 ml mobilní fáze za jednu minutu. Po skončení byla kolona promyta destilovanou vodou, poté 20% (v/v) etanolem a odpojena.

Velikost a čistota frakcí získaných gelovou permeační chromatografií byla ověřena pomocí SDS elektroforézy na 15% (v/v) polyakrylamidovém gelu (postup viz [6]).

Před druhou gelovou permeační chromatografií byly vybrané frakce zkoncentrovány pomocí koncentrátoru (Amicon Ultra, 10 000 MWCO, 1500 µl) při 3 000 ot./min a teplotě 4 °C.

4.3.8 UV-VIS spektrofotometrické stanovení koncentrace

Orientační měření koncentrace proteinového vzorku bylo prováděno na UV-VIS spektrofotometru Cecil Instrument, 8000 Series. Absorbance (*A*) získaných vzorků byla měřena při vlnové délce 280 nm proti vzorku pufru použitým při poslední gelové permeační chromatografii. Vzorky byly měřeny v křemenné kyvetě, délka optické dráhy (*l*) byla 1 cm. Molární absorpční koeficient (ϵ) pro TH1R byl vypočten na základě obsahu aromatických aminokyselin pomocí internetového programu ProParam tool [1] a jeho hodnota byla $2980 \cdot 10^{-4} \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Výsledná molární koncentrace (*c*) byla vypočtena podle rovnice (1).

$$A = \epsilon l c \quad (1)$$

4.3.9 Dynamický rozptyl světla

Pro získání informací o stupni polydisperzity vzorku (přítomnosti agregovaných či oligomerních forem proteinu) bylo provedeno měření dynamického rozptylu světla. Intenzita rozptýleného světla kolísá v čase díky neuspořádanému pohybu částic v roztoku. Rychlost pohybu částic závisí na jejich hydrodynamickém poloměru. Časová závislost fluktuace rozptýleného záření proto obsahuje informaci o velikosti částic. Časová závislost intenzity rozptýleného záření je vyhodnocována pomocí autokorelační funkce [70].

Před samotným měřením bylo vždy nutné vzorek zakoncentrovat, přefiltrovat a jeho stabilitu překontrolovat pomocí SDS-PAGE (všechny postupy popsány dříve). Měření probíhala na dvou typech přístrojů:

a) DLS analyzátor Laser-Spectroscatter 201

Do kyvety bylo pomocí automatické pipety umístěno 15 μl vzorku, tak aby měřený vzorek neobsahoval žádné viditelné vzduchové bubliny. Poté byla kyveta se vzorkem umístěna do držáku přístroje a zapnut laser. Měření probíhalo při vlnové délce 532 nm při teplotě 20 °C. Odražený paprsek je u tohoto spektrometru sbírán do analyzátoru pod úhlem 90°.

b) DLS analyzátor ALV

Pro druhé měření dynamického rozptylu světla byl použit přístroj ALV s 22 mW He-Ne laserem o vlnové délce 632,8 nm. Vzorek o objemu 0,5 ml byl umístěn do skleněné kyvety. Měření probíhalo za teploty 25 °C pod úhly rozptylu 45°, 90° a 135°. Z časové závislosti intenzity rozptýleného světla, $I(t)$, byly vypočteny autokorelační funkce $g^{(2)}(\tau)$ podle rovnice

$$g^{(2)}(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t+\tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2}, \quad (2)$$

kde τ je doba prodlevy. Tyto funkce byly následně vyhodnoceny pomocí rovnice

$$g^{(2)}(\tau) = 1 + \beta \left[\int_0^\infty A(\tau_r) \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_r}\right) d\tau_r \right]^2, \quad (3)$$

kde β je faktor koherence a $A(\tau_r)$ je distribuční funkce relaxačních dob, τ_r .

Za předpokladu, že pozorované fluktuace rozptýleného záření jsou způsobeny translační difúzí rozptylujících částic, potom střední hydrodynamický poloměr rozptylujících částic odpovídá době relaxace τ_r a lze jej vypočítat podle rovnice

$$R_H = \frac{8\pi n_0^2 k_B T}{3\eta_0 \lambda^2} \sin^2\left(\frac{\theta}{2}\right) \tau_r \quad (4)$$

kde parametry n_0 a h_0 jsou index lomu a viskozita rozpouštědla, k_B je Boltzmannova konstanta [$1,38062 \cdot 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$] a T termodynamická teplota [K].

4.3.10 Nukleární magnetická rezonance

Pro naměření ^1H spektra nukleární magnetickou rezonancí (NMR) bylo nutné, stejně jako v předchozích případech, vzorek zakoncentrovat pomocí koncentrátoru na objem 400 μl . Koncentrace vzorku musela dosahovat minimální hodnoty $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ (přibližně $2,5 \text{ mg ml}^{-1}$) a musela obsahovat 10% D_2O . Ke 400 μl vzorku bylo přidáno 45 μl D_2O . Pro měření byl použit NMR spektrometr Bruker Avance III s vodíkovou frekvencí 600 MHz a kryosonda. Potlačení signálu vody bylo provedeno metodou watergate.

5 Výsledky

Regulační doména lidské tyrosinhydroxylasy je nestrukturovaný protein [5], který se vyznačuje problematickým chováním v roztocích. Při optimalizaci purifikačního protokolu bylo nutné brát v úvahu jeho tendence agregovat a podléhat proteolýze. Pro další studie a měření byla bezpodmínečně nutná příprava dostatečného množství stabilního, neagregovaného a nedegradovaného proteinu.

5.2 Exprese a purifikace TH1R pro NMR měření

Expresa a purifikace proteinu TH1R probíhala podle protokolu optimalizovaného v mé bakalářské práci [6]. Protein TH1R byl exprimován v bakteriích *Escherichia Coli* kmen BL21 (DE3) při teplotě 20 °C po dobu dvanácti hodin. Teplota exprese byla, oproti běžně používaným 37 °C, snížena z důvodu nutného zpomalení exprese a omezení agregace proteinu. Bakterie *Escherichia Coli* BL21 (DE3) jsou kmenem vhodným pro účinnou expresi proteinu TH1R indukovatelnou pomocí IPTG a případné dlouhodobé uskladnění.

Pro řešení struktury proteinu TH1R pomocí NMR měření bude potřeba připravit 100% izotopově značený protein. Pro simulaci tohoto procesu byl protein TH1R posledních šest purifikací exprimován v tzv. minimálních médiu, kde jediným zdrojem dusíku byl NH_4Cl a jediným zdrojem uhlíku glukosa.

Purifikace proteinu TH1R se skládala ze dvou, případně i tří po sobě následujících chromatografických metod. cDNA pro TH1R byla zaklonována do vektoru pET-15b, proto N-konec získaného rekombinantního proteinu TH1R obsahoval motiv šesti po sobě jdoucích histidinů tzv. histidinovou kotvou (6×His-tag). Díky tomu bylo možné při purifikaci využít niklovou chelatační chromatografii, při níž se protein s vysokou afinitou zachycuje na kationtech Ni^{2+} chelatovaných na koloně. Následovala dialýza vybraných proteinových frakcí. Druhou a případně i třetí chromatografickou metodou byla gelová permeační chromatografie prováděná na koloně SuperdexTM 200 s polární mobilní fází za průtoku 0,5 ml min⁻¹. Čistota proteinu byla po každém kroku analyzována pomocí SDS-PAGE na 15% (v/v) polyakrylamidovém gelu. Relativní molekulová hmotnost rekombinantního TH1R proteinu byla 19 500.

5.3 Optimalizace purifikačního protokolu

Podmínky nutné pro měření roztoku proteinu TH1R pomocí NMR se lišily od protokolu navrženého v mé bakalářské práci [6]. Bylo nutné protein převést do fosfátového pufru o koncentraci $20 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ a pH 7. Co nejvíce snížit iontovou sílu roztoku a přitom zajistit, aby se TH1R protein udržel po co nejdelší dobu ve stabilním neagregovaném stavu při minimální měřitelné koncentraci $0,1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ a objemu minimálně 400 μl .

Velká pozornost byla věnována zejména parametrům, které mohou ovlivňovat a podporovat tendence proteinu TH1R agregovat a podléhat degradaci.

5.3.1 Změna podmínek sonikace

Při sonikaci dochází k rozrušování povrchu bakteriálních buněk pomocí ultrazvuku. Tento proces může způsobovat zahřívání sonikovaného roztoku, což může zapříčinit zvýšení aktivity proteolytických enzymů nebo případnou denaturaci proteinu vlivem zvýšené teploty.

Podmínky sonikace byly zmírněny zkrácením délky pulzu na 3 s a změny prodlevy mezi pulzy na 17 s. Oproti mé bakalářské práci kde byly použity pulzy dlouhé 10 s prokládané 50 s pauzami [6]. Při sonikaci resuspendovaných bakterií získaných ze tří litrů bakteriální kultury byl původní celkový čas působení ultrazvuku 15 min snížen na 10 min.

5.3.2 Další podmínky, přidavek detergentu a inhibitoru proteas

Dalším faktorem, který má vliv na agregaci proteinu, jsou teploty nižší než 0 °C. Proto bylo vyřazeno veškeré mražení, ať již buněk před sonikací, nebo výsledného sonikátu a celý proces purifikace byl co nejvíce urychlen.

Velký podíl agregovaného proteinu také vznikl při purifikaci prováděné z celých šesti litrů bakteriální kultury najednou. Z tohoto důvodu bylo sníženo množství současně purifikovaného proteinu. Jako ideální se ukázaly purifikace ze tří litrů bakteriální kultury. V případě kultivace na minimálním médiu bylo z důvodu nižšího

výtěžku proteinu nutné provádět purifikace z šesti litrů. Pro zamezení agregace proteinu bylo v tomto případě potřeba rozdělit sonikát na dvě poloviny a provést dvě oddělené niklové chelatační chromatografie. Další postup byl standardní.

Ve výsledných purifikacích již všechny používané pufrы obsahovaly 0,01% (v/v) detergent NP-40. Výjimkou byl fosfátový pufr použitý pro finální přípravu vzorku pro NMR měření. Tento detergent se váže na hydrofobní plochy purifikovaného proteinu a zabráňuje tak jeho agregaci způsobené hydrofobními interakcemi. Hlavním významem použití detergentu NP-40 je tedy zvýšení rozpustnosti hydrofobních proteinů.

Z důvodu ochrany proteinu TH1R před degradací proteolytickými enzymy během extrakčního a purifikačního procesu byla při purifikaci VI do roztoku resuspendovaných buněk přidána směs inhibitorů proteas (Protease Inhibitor Cocktail Tablet).

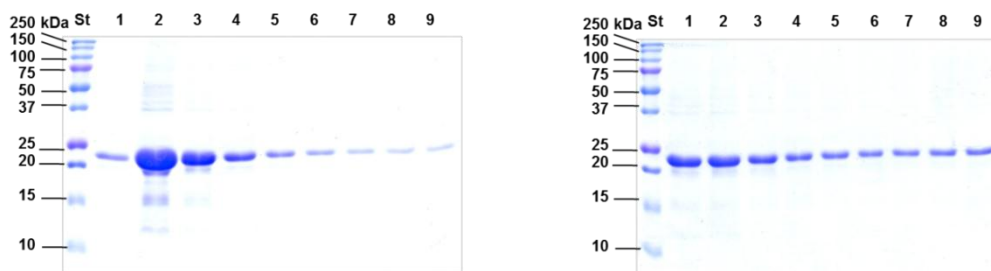
5.3.3 Optimalizace niklové chelatační chromatografie

Jako další problém se ukázala nízká čistota proteinu po niklové chelatační chromatografii. Pro zlepšení čistoty tohoto purifikačního kroku bylo nutné změnit postup promývání proteinu zachyceného na kationtech Ni^{2+} chelatovaných na sepharosových částicích náplně kolony. Byly otestovány tři způsoby provedení této chromatografie: promývání sepharosy s navázaným fúzním proteinem přímo v koloně připojené k peristaltické pumpě, promývání vsádkově pomocí centrifugace při 1600 ot./min a také niklová chelatační chromatografie na přístroji pro FPLC.

Promývání sonikátu získaného ze tří litrů bakteriální kultury původními 300 ml 10% (v/v) roztoku pufru F v pufru E (složení viz tabulka 4.4 na straně 30) za využití centrifugace bylo vyhodnoceno jako nedostačující. Proto byl sonikát získaný ze tří litrů bakteriální kultury pěstované na minimálním médiu zachycený na náplni kolony rozdělen na dvě poloviny a bylo provedeno oddělené promývání pomocí 300 ml 12% (v/v) pufru F a ve druhém případě pomocí 300 ml 15% (v/v) pufru F. Výsledek z obou odděleně provedených niklových chromatografií byl porovnán pomocí SDS-PAGE na 15% (v/v) polyakrylamidovém gelu (viz obrázek 5.1 na straně 38). Z výsledných gelů je patrné, že při promytí kolony 15% (v/v) roztokem pufru F v pufru E získáme

výrazně čistější roztok proteinu TH1R, avšak za cenu snížení jeho výsledné koncentrace.

Na základě tohoto pozorování bylo dále používáno 500 ml 15% (v/v) roztoku pufru F v pufru E na promývání roztoku proteinu získaného ze tří litrů bakteriální kultury kultivované na minimálním médiu. Promývání bylo provedeno vsádkově za použití centrifugace při 1600 ot./min.



Obrázek 5.1: 15% (v/v) polyakrylamidové gely z SDS-PAGE obsahující proteinový standard molekulových vah (St) a vzorky frakcí 1 až 9 eluované při niklové chelatační chromatografii. Gel vlevo je výsledkem chromatografie, při níž byl k promývání použit roztok 12% (v/v) pufru F v pufru E a gel vpravo ukazuje čistotu proteinového vzorku získanou po promývání 15% roztokem pufru F v pufru E.

5.4 Výsledky klíčových purifikací

Jednotlivé parametry uvedené v kapitole 5.3 byly testovány v rámci třinácti samostatných purifikací, ze kterých byly vybrány klíčové purifikace obsahující zásadní změny původně navrženého protokolu.

5.4.1 Purifikace I

Změny byly realizovány v následujících krocích:

Sonikace: Na roztok resuspendovaných buněk získaných ze tří litrů bakteriální kultury působil ultrazvuk po celkovou dobu 10 min. Délka pulzu byla vždy 3 s a délka prodlevy mezi pulzy trvala 17 s.

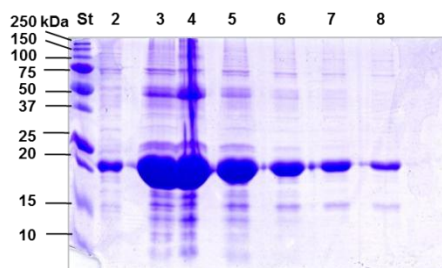
Niklová chelatační chromatografie: Tento purifikační krok byl proveden vsádkovou metodou (viz kapitola 4.3.4.). K promývání náplně kolony bylo použito 300 ml 10% (v/v) pufru F. Výsledný 15% (v/v) polyakrylamidový gel z SDS-PAGE je uveden na obrázku 5.2.

Dialýza: Pro další purifikaci byly vybrány frakce 2 až 8 eluované při niklové chelatační chromatografii, které byly následně dialyzovány proti pufru: $20 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ TRIS (pH 7,5), $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ NaCl, $0,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ EDTA, 0,01% (v/v) NP-40, voda.

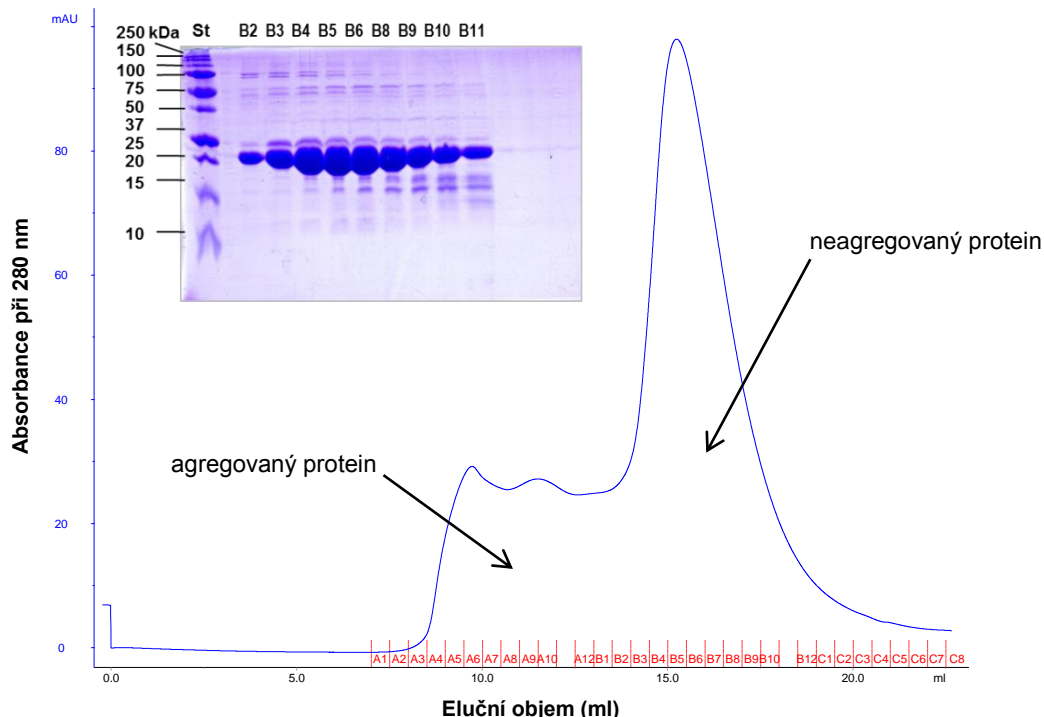
Gelová permeační chromatografie: Dialyzovaný vzorek byl zakoncentrován a následně separován na koloně SuperdexTM 200 s průtokovou rychlostí mobilní fáze $0,5 \text{ ml min}^{-1}$. Složení mobilní fáze: $20 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ TRIS (pH 7,5), $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ NaCl, $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ EDTA, 0,01% (v/v) NP-40, 10% (v/v) glycerol, voda. Výsledný chromatogram a 15% (v/v) polyakrylamidový gel je uveden na obrázku 5.3 na straně 40. Pro výsledné zakoncentrování byly vybrány a sloučeny frakce B5 až B9.

Detergent: Ve všech použitých pufrech byl přítomen 0,01% (v/v) detergent NP-40.

Výsledky: Purifikací I bylo získáno přibližně 6,7 mg proteinu TH1R ze tří litrů bakteriální kultury kultivované v LB-médiu. Protein byl v neagregovaném stavu, jak potvrdilo i následující měření dynamického rozptylu světla (viz obrázek 5.17 na straně 54).



Obrázek 5.2: 15% (v/v) polyakrylamidový gel z SDS-PAGE obsahující proteinový standard molekulových vah (St) a vzorky proteinových frakcí číslo 2 až 8 eluovaných při niklové chelatační chromatografii v odpovídajícím pořadí. K promývání byl použit 10% (v/v) pufr F.



Obrázek 5.3: Chromatogram získaný při gelové permeační chromatografii. Na ose x je vynesena eluční objem a na ose y hodnoty absorbance naměřené při vlnové délce 280 nm. Mobilní fázi byl přefiltrovaný dialyzační pufr (složení viz strana 31) a rychlost jeho průtoku byla $0,5 \text{ ml min}^{-1}$. Vybrané frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE. Fotografie výsledného 15% (v/v) polyakrylamidového gelu zobrazuje proteinový standard (St) a vybrané proteinové frakce B2 až B11 obsahující neagregovaný protein.

5.4.2 Purifikace II

Pro měření pomocí NMR spektroskopie bylo nutné protokol z purifikace I změnit následujícím způsobem:

Sonikace: Byla sonikována pouze 1/3 pelety získané z šesti litrů bakteriální kultury kultivované v LB-médiu. Ultrazvuk byl zapnutý po celkovou dobu 10 min. Délka pulzu byla vždy 3 s a délka prodlevy mezi pulzy trvala 17 s.

Niklová chelatační chromatografie: Tento purifikační krok byl proveden vsádkovou metodou (viz kapitola 4.3.4.). K promývání náplně kolony bylo

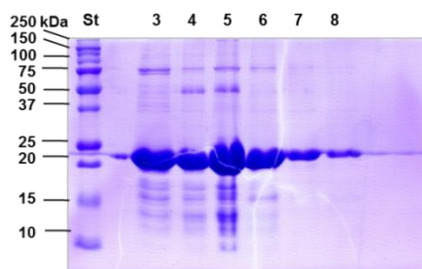
použito 300 ml 10% (v/v) pufru F. Výsledný 15% (v/v) polyakrylamidový gel z SDS-PAGE je uveden na Obrázku 5.4.

Dialýza: Pro další purifikaci byly vybrány frakce 3 až 8 eluované při niklové chelatační chromatografii, které byly následně dialyzovány proti fosfátovému pufru, jehož pH bylo 7, koncentrace $20 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ a který obsahoval NaCl o koncentraci $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$. Vzorek již na počátku dialýzy silně precipitoval, proto bylo nutné vzniklý precipitát odebrat a vzorkem naplnit novou dialyzační membránu.

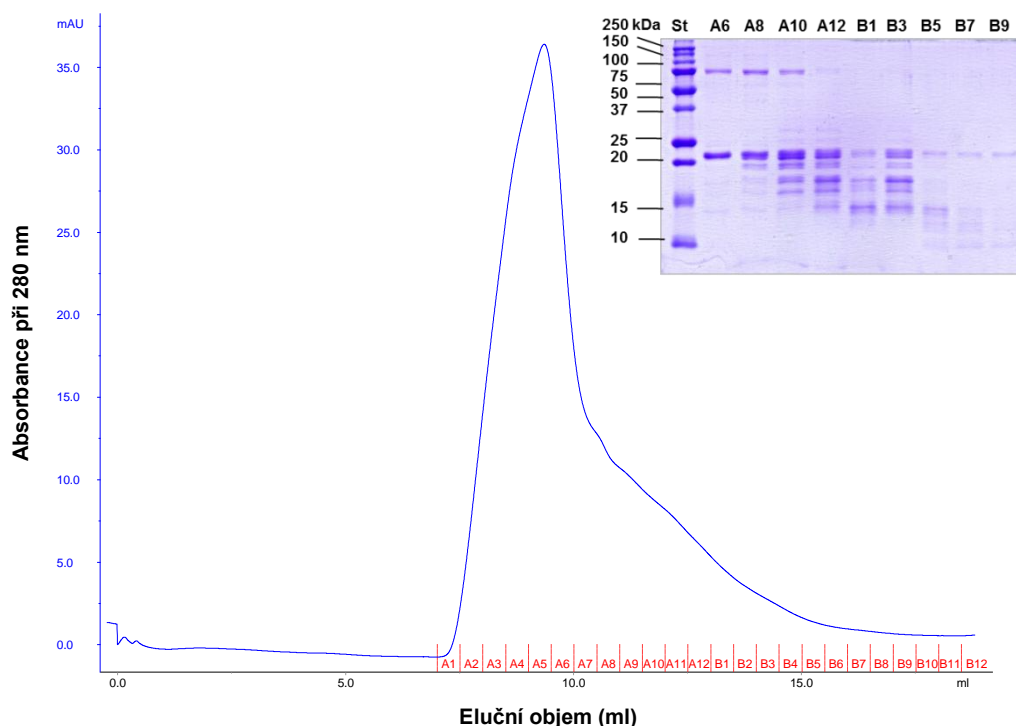
Gelová permeační chromatografie: Dialyzovaný vzorek byl zakonzentrován a následně separován na koloně Superdex™ 200 s průtokovou rychlostí mobilní fáze $0,5 \text{ ml min}^{-1}$. Složení mobilní fáze: fosfátový pufr pH 7 a koncentrace $20 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ a NaCl o koncentraci $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$. Výsledný chromatogram a 15% polyakrylamidový gel jsou uvedeny na obrázku 5.5 na straně 42.

Detergent: Ve všech použitých pufrech byl přítomen 0,01% (v/v) detergent NP-40.

Výsledky: K purifikaci byla použita přibližně 1/3 resuspendovaných buněk pocházejících z šesti litrů bakteriální kultury kultivované v LB-médiu. Podle chromatogramu z gelové permeační chromatografie byl získán TH1R protein v agregovaném stavu a podle výsledku vyplývajícího z SDS-PAGE na obrázku 5.5 na straně 42 došlo i k jeho degradaci.



Obrázek 5.4: 15% (v/v) polyakrylamidový gel z SDS-PAGE obsahující proteinový standard molekulových vah (St) a vzorky proteinových frakcí číslo 3 až 8 eluovaných při niklové chelatační chromatografii v odpovídajícím pořadí. K promývání kolony byl použit 10% (v/v) roztok pufru F.



Obrázek 5.5: Chromatogram získaný při gelové permeační chromatografii. Na ose x je vynesena eluční objem a na ose y hodnoty absorbance naměřené při vlnové délce 280 nm. Mobilní fázi byl fosfátový ($\text{pH} = 7$, koncentrace $20 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$), který obsahoval NaCl o koncentraci $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$. Rychlost průtoku mobilní fáze byla $0,5 \text{ ml min}^{-1}$. Vybrané frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE. Fotografie výsledného 15% polyakrylamidového gelu zobrazuje proteinový standard (St) a vybrané proteinové frakce A6, A8, A10 a A12 obsahující agregovaný protein a frakce B1, B3, B5, B7 a B9, ve kterých se obvykle nacházel neagregovaný protein.

5.4.3 Purifikace III

Vzhledem k nevyhovujícímu výsledku purifikace II bylo nutné navýšit obsah NaCl ve fosfátovém pufru a do purifikačního procesu byla přidána ještě jedna gelová permeační chromatografie:

Sonikace: Byla sonikována pouze 1/3 pelety získané z šesti litrů bakteriální kultury kultivované v LB-médiu. Ultrazvuk byl zapnutý po celkovou dobu 10 min. Délka pulzu byla vždy 3 s a délka prodlevy mezi pulzy trvala 17 s.

Niklová chelatační chromatografie: Tento purifikační krok byl proveden vsádkovou metodou (viz kapitola 4.3.4.). K promývání náplně kolony bylo použito 300 ml 10% (v/v) pufru F. Výsledný 15% (v/v) polyakrylamidový gel z SDS-PAGE je uveden na obrázku 5.6 na straně 44.

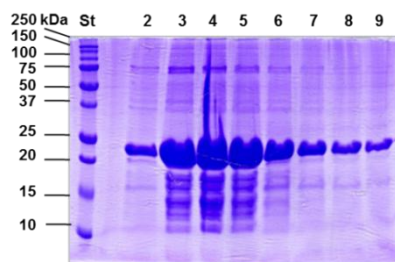
Dialýza: Pro další purifikaci byly vybrány frakce 2 až 9 eluované při niklové chelatační chromatografii, které byly následně dialyzovány proti pufru: $20 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ TRIS (pH 7,5), $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ NaCl, $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ EDTA, 0,01% (v/v) NP-40, voda.

1. Gelová permeační chromatografie: Dialyzovaný vzorek byl zakoncentrován a následně separován na koloně SuperdexTM 200 s průtokovou rychlostí mobilní fáze $0,5 \text{ ml min}^{-1}$. Složení mobilní fáze: $20 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ TRIS (pH 7,5), $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ NaCl, $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ EDTA, 0,01% (v/v) NP-40, 10% (v/v) glycerol, voda. Výsledný chromatogram a 15% (v/v) polyakrylamidový gel je uveden na obrázku 5.7 na straně 44.

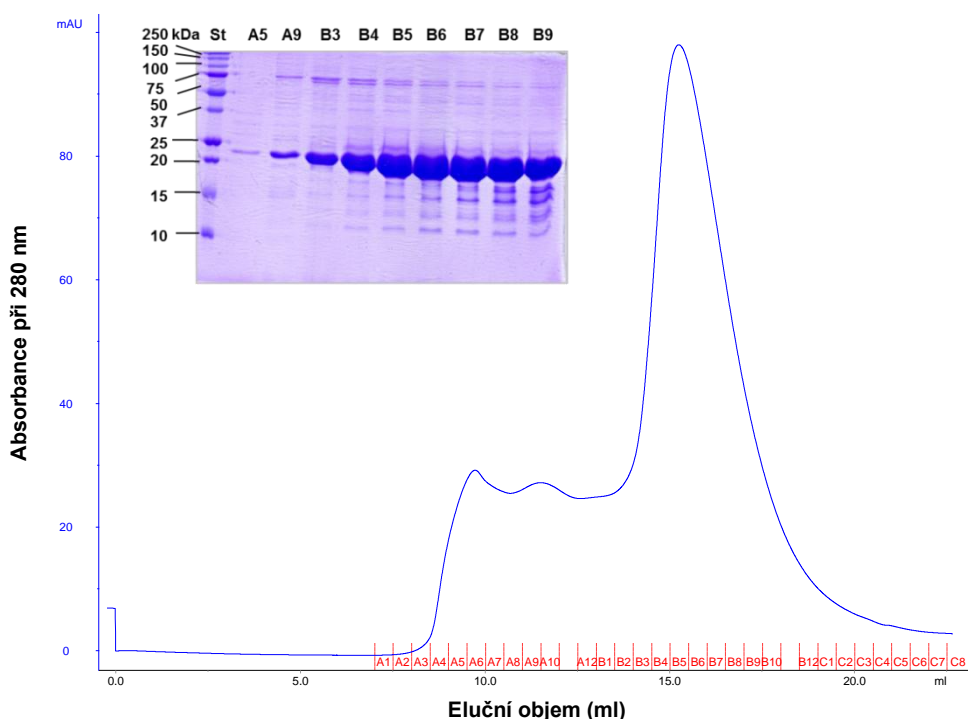
2. Gelová permeační chromatografie: Frakce B3 až B10 z první gelové permeační chromatografie (viz obrázek 5.7 strana 44) byly zakoncentrovány a následně separovány na koloně SuperdexTM 200 s průtokovou rychlostí mobilní fáze $0,5 \text{ ml min}^{-1}$. Složení mobilní fáze: fosfátový pufr pH 7 o koncentraci $20 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ a NaCl o koncentraci $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$. Výsledný chromatogram a 15% (v/v) polyakrylamidový gel jsou uvedeny na obrázku 5.8 na straně 45. Pro výsledné zakoncentrování byly vybrány a sloučeny frakce B3 až B9.

Detergent: Ve všech použitých pufrech byl přítomen 0,01% (v/v) detergent NP-40.

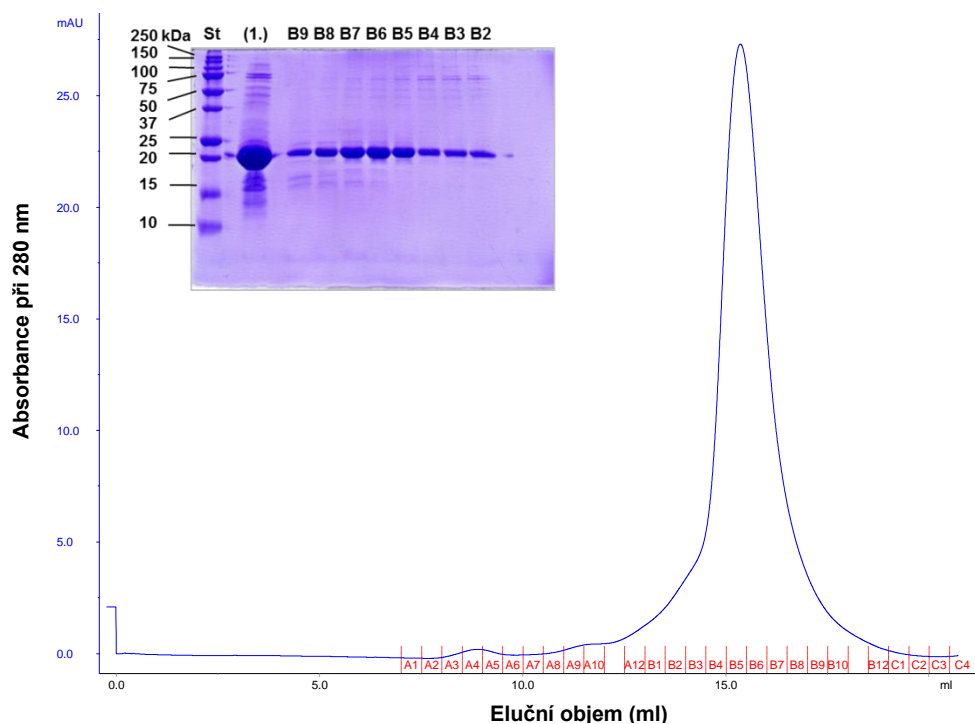
Výsledky: Purifikací III bylo získáno 2,7 mg proteinu TH1R z roztoku, který byl získán z 1/3 pelety z šesti litrů bakteriální kultury kultivované v LB-médiu. Protein byl v neagregovaném stavu a byl dále použit pro měření pomocí nukleární magnetické rezonance. Získané jednodimenzionální $^1\text{H-NMR}$ spektrum se nachází na obrázku 5.19 na straně 57.



Obrázek 5.6: 15% (v/v) polyakrylamidový gel z SDS-PAGE obsahující proteinový standard molekulových vah (St) a vzorky proteinových frakcí číslo 2 až 9 eluovaných při niklové chelatační chromatografii v odpovídajícím pořadí. K promývání kolony byl použit 10% (v/v) roztok pufru F.



Obrázek 5.7: Chromatogram získaný při gelové permeační chromatografii. Na ose x je vynesena eluční objem a na ose y hodnoty absorbance naměřené při vlnové délce 280 nm. Mobilní fázi byl přefiltrovaný dialyzační pufr (složení viz strana 31) a rychlost průtoku mobilní fáze byla $0,5 \text{ ml min}^{-1}$. Vybrané frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE. Fotografie 15% (v/v) gelu zobrazuje proteinový standard (St), frakce A5 a A9 obsahující agregovaný protein a proteinové frakce B3 až B9 obsahující protein neagregovaný.



Obrázek 5.8: Chromatogram, který byl získán při druhé gelové permeační chromatografii. Na ose x je vynesena eluční objem a na ose y hodnoty absorbance naměřené při vlnové délce 280 nm. Mobilní fází byl fosfátový pufr ($\text{pH} = 7$, koncentrace $20 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$), který obsahoval NaCl o koncentraci $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$. Rychlost průtoku mobilní fáze byla $0,5 \text{ ml min}^{-1}$. Vybrané frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE. Fotografie 15% (v/v) gelu zobrazuje proteinový standard (St), vzorek (1.) z předchozí chromatografie a frakce B2 až B9 obsahující neagregovaný protein.

5.4.4 Purifikace IV

Vysoký obsah NaCl ve vzorku není pro NMR měření vhodný. Proto byla koncentrace NaCl ve fosfátovém pufru snížena na $0,3 \text{ mol dm}^{-3}$.

Sonikace: Byla sonikována pouze 1/3 pelety získané z šesti litrů bakteriální kultury kultivované v LB-médiu. Ultrazvuk byl zapnutý po celkovou dobu 10 min. Délka pulzu byla vždy 3 s a délka prodlevy mezi pulzy trvala 17 s.

Niklová chelatační chromatografie: Tento purifikační krok byl proveden vsádkovou metodou (viz kapitola 4.3.4.). K promývání náplně kolony bylo

použito 300 ml 10% (v/v) pufru F. Výsledný 15% (v/v) polyakrylamidový gel z SDS-PAGE je uveden na obrázku 5.9 na straně 47.

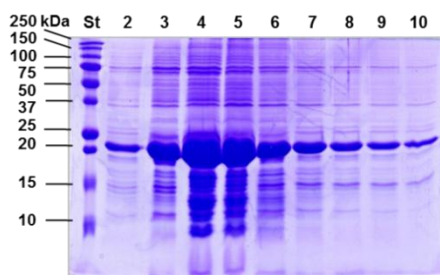
Dialýza: Pro další purifikaci byly vybrány frakce 2 až 9 eluované při niklové chelatační chromatografii, které byly následně dialyzovány proti pufru: $20 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ TRIS (pH 7,5), $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ NaCl, $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ EDTA, 0,01% (v/v) NP-40, voda.

1. Gelová permeační chromatografie: Dialyzovaný vzorek byl zbaven precipitátu, zakoncentrován a následně separován na koloně SuperdexTM 200 s průtokovou rychlostí mobilní fáze $0,5 \text{ ml min}^{-1}$. Složení mobilní fáze: $20 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ TRIS (pH 7,5), $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ NaCl, $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ EDTA, 0,01% (v/v) NP-40, 10% (v/v) glycerol, voda. Výsledný chromatogram a 15% (v/v) polyakrylamidový gel je uveden na obrázku 5.10 na straně 47.

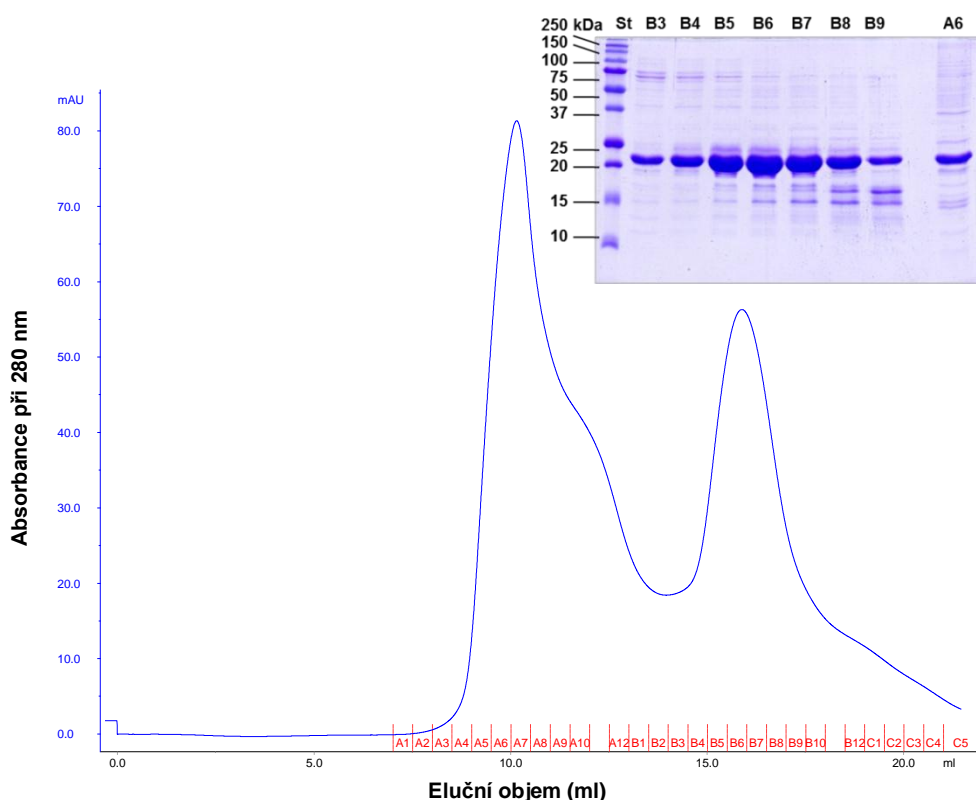
2. Gelová permeační chromatografie: Frakce B4 až B9 z první gelové permeační chromatografie (viz obrázek 5.10 na straně 47) byly zakoncentrovány a následně separovány na koloně SuperdexTM 200 s průtokovou rychlostí mobilní fáze $0,5 \text{ ml min}^{-1}$. Složení mobilní fáze: fosfátový pufr pH 7 a koncentrace $20 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ a NaCl o koncentraci $0,3 \text{ mol dm}^{-3}$. Výsledný chromatogram a 15% (v/v) polyakrylamidový gel jsou uvedeny na obrázku 5.11 na straně 48.

Detergent: Ve všech použitých pufrech byl přítomen 0,01% (v/v) detergent NP-40.

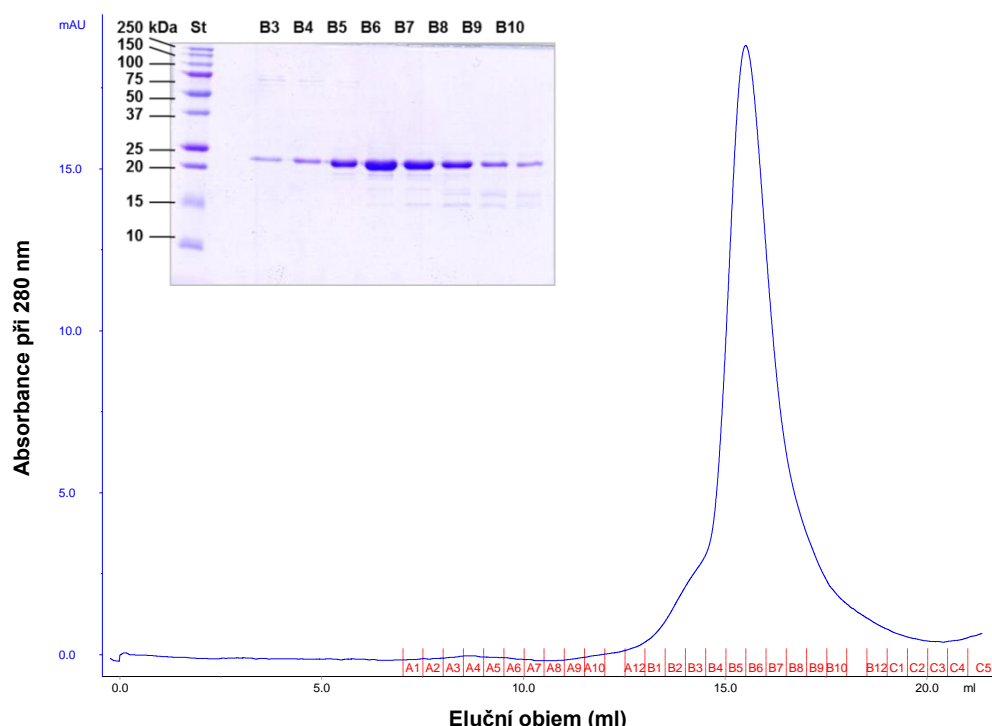
Výsledky: Purifikací IV bylo získáno přibližně 3,2 mg proteinu TH1R z roztoku, který byl získán z 1/3 pelety z šesti litrů bakteriální kultury kultivované v LB-médiu. Protein byl v neagregovaném stavu, což bylo následně potvrzeno i měřením dynamického rozptylu světla. Získané výsledky jsou zobrazeny na obrázku 5.18 na straně 55.



Obrázek 5.9: Výsledný 15% (v/v) polyakrylamidový gel obsahující proteinový standard molekulových vah (St) a vzorky frakcí 2 až 10 eluovaných při niklové chelatační chromatografii v odpovídajícím pořadí. K promývání kolony byl použit 10% (v/v) pufr F.



Obrázek 5.10: Chromatogram získaný při gelové permeační chromatografii. Na ose x je vynesena eluční objem a na ose y hodnoty absorbance naměřené při vlnové délce 280 nm. Mobilní fází byl přefiltrovaný dialyzační pufr (složení viz strana 31) a rychlost jeho průtoku byla $0,5 \text{ ml min}^{-1}$. Vybrané frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE. Fotografie výsledného 15% (v/v) polyakrylamidového gelu zobrazuje proteinový standard (St), frakci A6 obsahující agregovaný protein a vybrané proteinové frakce B3 až B9 obsahující neagregovaný protein.



Obrázek 5.11: Chromatogram, který byl získán při druhé gelové permeační chromatografii. Na ose x je vynesena eluční objem a na ose y hodnoty absorbance naměřené při vlnové délce 280 nm. Mobilní fáze byl fosfátový pufr ($\text{pH} = 7$, koncentrace $20 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$), který obsahoval NaCl o koncentraci $0,3 \text{ mol dm}^{-3}$. Rychlost průtoku mobilní fáze byla $0,5 \text{ ml min}^{-1}$. Vybrané frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE. Fotografie 15% (v/v) polyakrylamidového gelu zobrazuje proteinový standard (St) a frakce B3 až B10 obsahující neagregovaný protein TH1R.

5.4.5 Purifikace V

Pro přípravu proteinového vzorku 100% značeného izotopy ^{15}N a ^{13}C bylo nutné nejdříve otestovat kultivaci bakterií *E. coli* v minimálním médiu a optimalizovat protokol následujícím způsobem:

Sonikace: Na roztok resuspendovaných buněk získaných ze tří litrů bakteriální kultury, kultivované na minimálním médiu, působil ultrazvuk po celkovou dobu 10 min. Délka pulzu byla vždy 3 s a délka prodlevy mezi pulzy trvala 17 s.

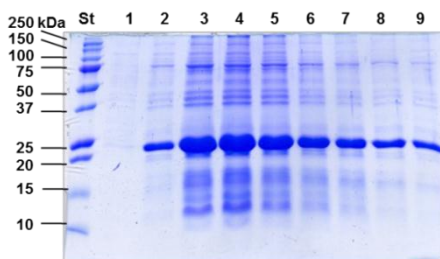
Niklová chelatační chromatografie: Tento purifikační krok byl proveden vsádkovou metodou (viz kapitola 4.3.4.). K promývání náplně kolony bylo použito 300 ml 10% (v/v) pufru F. Výsledný 15% (v/v) polyakrylamidový gel z SDS-PAGE je uveden na obrázku 5.12.

Dialýza: Pro další purifikaci byly vybrány frakce 2 až 9 eluované při niklové chelatační chromatografii, které byly následně dialyzovány proti pufru: $20 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ TRIS (pH 7,5), $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ NaCl, $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ EDTA, 0,01% (v/v) NP-40, voda.

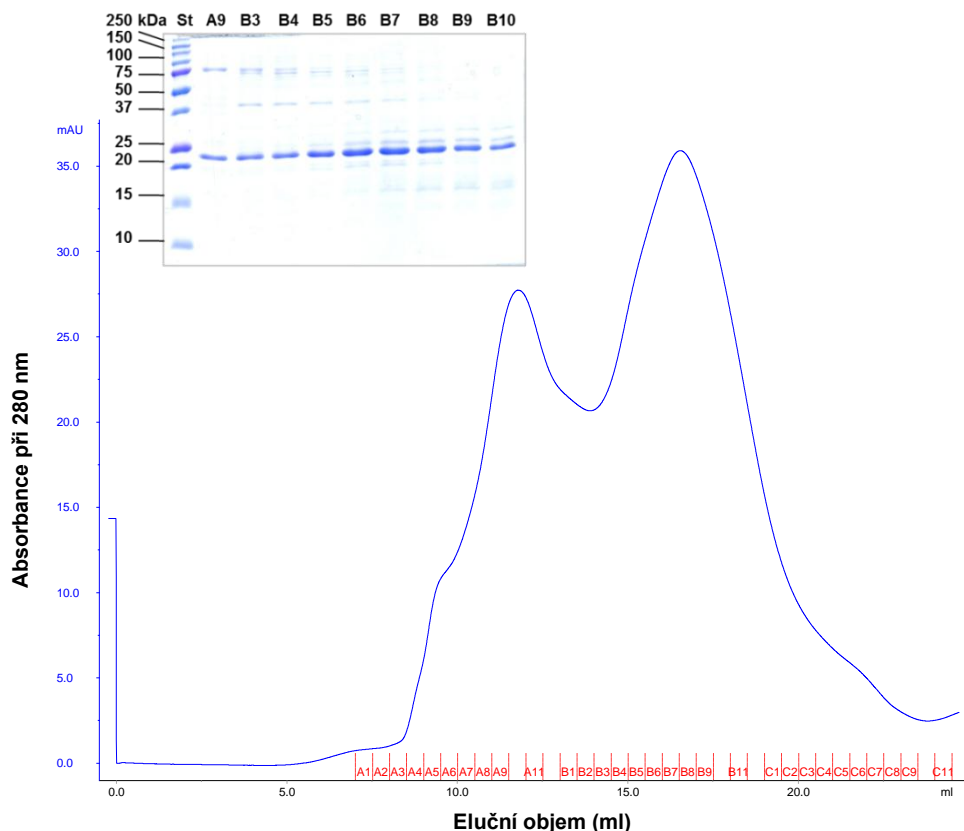
Gelová permeační chromatografie: Dialyzovaný vzorek byl zakoncentrován a následně separován na koloně SuperdexTM 200 s průtokovou rychlostí mobilní fáze $0,5 \text{ ml min}^{-1}$. Složení mobilní fáze: fosfátový pufr pH 7 a koncentrace $20 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ a NaCl o koncentraci $0,3 \text{ mol dm}^{-3}$. Výsledný chromatogram a 15% (v/v) polyakrylamidový gel jsou uvedeny na obrázku 5.13 na straně 50. Pro další měření byly vybrány a zakoncentrovány frakce B3 až B10.

Detergent: Ve všech použitých pufrech byl přítomen 0,01% (v/v) detergent NP-40.

Výsledky: Purifikací IV bylo získáno 1,7 mg proteinu TH1R ze tří bakteriální kultury kultivované v minimálním médiu. Protein byl získán v neagregovaném stavu. Následně byla provedena analýza stability vzorku pomocí SDS-PAGE uvedená v kapitole 5.5 na stranách 52 a 53.



Obrázek 5.12: Výsledný 15% (v/v) polyakrylamidový gel obsahující proteinový standard molekulových vah (St) a vzorky frakcí 1 až 9 eluovaných při niklové chelatační chromatografii v odpovídajícím pořadí. K promývání kolony byl použit 10% (v/v) roztok pufru F v pufru E.



Obrázek 5.13: Chromatogram získaný při gelové permeační chromatografii. Na ose x je vynesena eluční objem a na ose y hodnoty absorpance naměřené při vlnové délce 280 nm. Mobilní fází byl přefiltrovaný fosfátový pufr ($\text{pH} = 7$, koncentrace $20 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$), který obsahoval NaCl o koncentraci $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$. Rychlost průtoku mobilní fáze byla $0,5 \text{ ml min}^{-1}$. Výsledný 15% (v/v) polyakrylamidový gel zobrazuje proteinový standard (St), frakci A9 obsahující agregovaný protein a proteinové frakce B3 až B10, které obsahovaly neagregovaný protein.

5.4.6 Purifikace VI

Dalším problémem, který bylo nutné vyřešit, byla nízká čistota proteinových frakcí eluovaných při niklové chelatační chromatografii. Na základě několika testů byl purifikační protokol nakonec modifikován následovně:

Sonikace: Do roztoku resuspendovaných buněk získaných z šesti litrů bakteriální kultury byl přidán inhibitor proteáz (Protease Inhibitor Cocktail Tablet) a na získaný roztok působil ultrazvuk po celkovou dobu 20 min. Délka pulzu byla vždy 3 s a délka prodlevy mezi pulzy trvala 17 s.

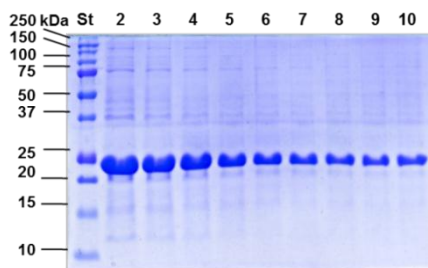
Niklová chelatační chromatografie: Před tímto purifikačním krokem byl sonikát rozdělen na dvě poloviny a byly provedeny dvě oddělené chromatografie vsádkovou metodou (viz kapitola 4.3.4.). K promývání náplně kolony bylo použito vždy 500 ml 15% (v/v) pufru F (celkově jeden litr 15% (v/v) pufru F). Výsledný 15% (v/v) polyakrylamidový gel z SDS-PAGE je uveden na obrázku 5.14.

Dialýza: Pro další purifikaci byly vybrány frakce 2 až 11 získané z obou niklových chelatačních chromatografií. Tyto frakce byly následně dialyzovány proti pufru: $20 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ TRIS (pH 7,5), $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ NaCl, 0,01% (v/v) NP-40, $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ EDTA.

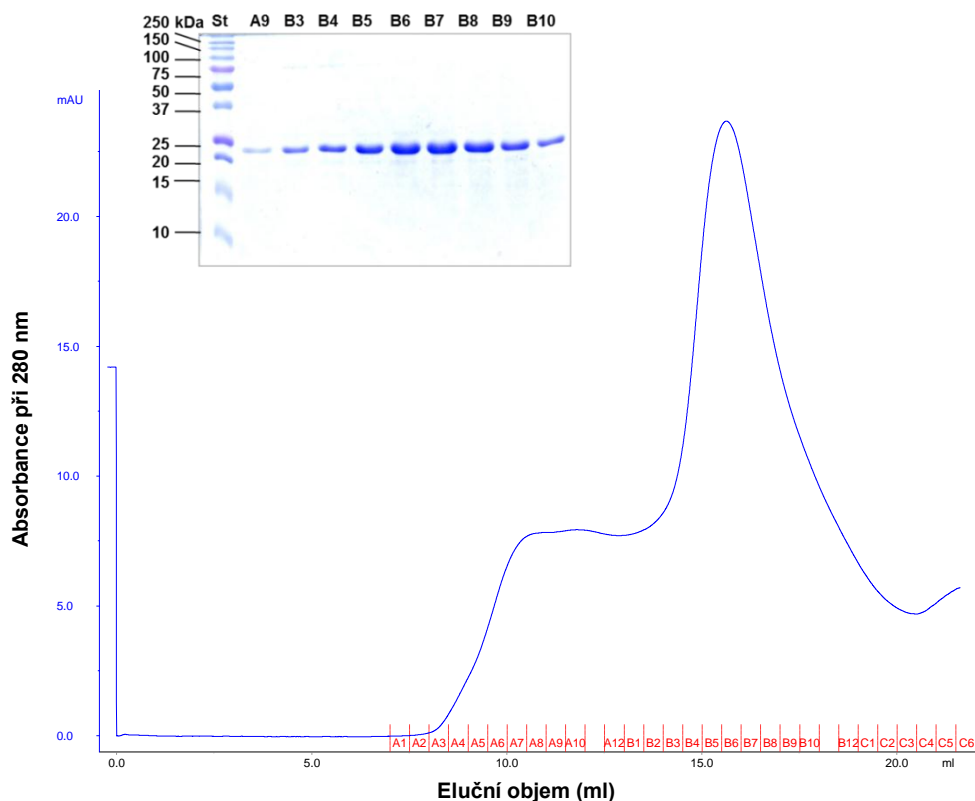
Gelová permeační chromatografie: Dialyzovaný vzorek byl zakoncentrován a následně separován na koloně SuperdexTM 200 s průtokovou rychlostí mobilní fáze $0,5 \text{ ml min}^{-1}$. Složení mobilní fáze: fosfátový pufr pH 7 a koncentrace $20 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ a NaCl o koncentraci $0,3 \text{ mol dm}^{-3}$. Výsledný chromatogram a 15% (v/v) polyakrylamidový gel jsou uvedeny na obrázku 5.15 na straně 52.

Detergent: Ve všech použitých pufrech byl přítomen 0,01% (v/v) detergent NP-40.

Výsledky: Purifikací VI bylo získáno 2,6 mg proteinu TH1R z šesti litrů bakteriální kultury kultivované v minimálním médiu. Protein byl získán v neagregovaném stavu.



Obrázek 5.14: Výsledný 15% (v/v) polyakrylamidový gel obsahující proteinový standard molekulových vah (St) a vzorky frakcí 2 až 10 eluovaných při niklové chelatační chromatografii v odpovídajícím pořadí. K promývání kolony byl použit 10% (v/v) pufr F.

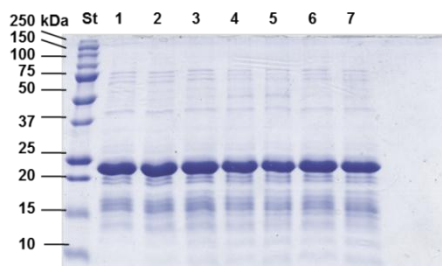


Obrázek 5.15: Chromatogram získaný při gelové permeační chromatografii. Na ose x je vynesena eluční objem a na ose y hodnoty absorbance naměřené při vlnové délce 280 nm. Mobilní fází byl fosfátový pufr ($\text{pH} = 7$, koncentrace $20 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$), který obsahoval NaCl o koncentraci $0,3 \text{ mol dm}^{-3}$. Rychlost průtoku mobilní fáze byla $0,5 \text{ ml min}^{-1}$. Vybrané frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE. Fotografie 15% (v/v) gelu zobrazuje proteinový standard (St), frakci A9 obsahující agregovaný protein a proteinové frakce B3 až B10 obsahující neagregovaný protein.

5.5 Analýza stability proteinu

Pro NMR měření je nutné, aby byl vzorek dostatečně stabilní, tedy aby nepodléhal proteolytické degradaci či agregaci. Pro otestování stability TH1R vůči proteolytické degradaci byla jedna část vzorku TH1R o koncentraci $1,7 \text{ mg ml}^{-1}$ získaného purifikací V inkubována při teplotě 6°C a druhá část při teplotě 18°C . Stabilita proteinu byla ověřena pomocí SDS-PAGE získané z postupně odebíraných vzorků. První odběr byl po čtyřdenní inkubaci a byly jím získány vzorky 2 a 3 a po dalších třech

dnech byly odebrány vzorky 4 a 5 a po následujících šesti dnech byly odebrány poslední vzorky 6 a 7. Výsledky získané z SDS-PAGE se nacházejí na obrázku 5.16.



Obrázek 5.16: 15% (v/v) gel získaný z SDS-PAGE vytvořený pro analýzu stability proteinu TH1R. (St) je proteinový standard molekulových vah, vzorek 1 je původní vzorek připravený při purifikaci V. Vzorky 2, 4 a 6 byly odebrány z části původního vzorku a inkubovány při teplotě 6 °C. Vzorky 3, 5 a 7 pocházejí ze stejného původního vzorku a byly inkubovány při 18 °C.

5.6 Biofyzikální charakterizace proteinu TH1R

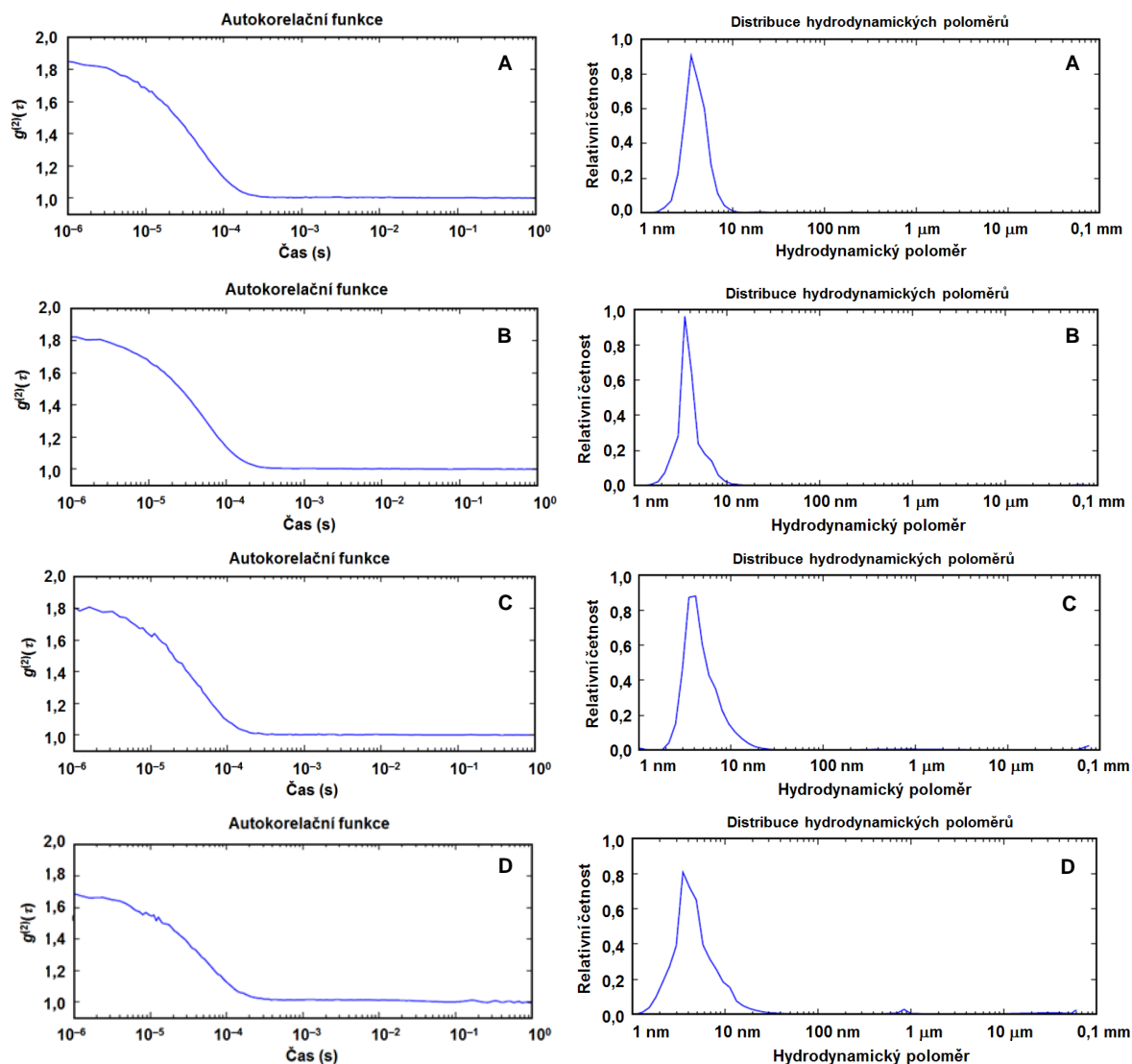
5.6.1 Dynamický rozptyl světla

Pro úspěšné studium struktury proteinu pomocí technik NMR je nutné, aby studovaný protein byl monodisperzní. Proto byla u připravených roztoků proteinu TH1R studována jejich monodisperzita pomocí dynamického rozptylu světla (DLS). Pro tyto experimenty byly použity koncentrované a přefiltrované vzorky získané z purifikací I a IV.

a) Výsledky DLS měřeného na přístroji Laser-Spectroscatter 201:

První měření byla realizována na ÚOCHB na přístroji Laser-Spectroscatter 201. Podmínky měření byly následující: vlnová délka 532 nm, úhel měření rozptýlených paprsků 90°, teplota 20 °C. Byla testována monodisperzita proteinu získaného v rámci purifikace I (viz strana 38). Dva vzorky proteinu z této purifikace byly inkubovány za různých podmínek. Vzorek A byl inkubován při teplotě v místnosti, vzorek B při teplotě 18 °C a vzorek C při teplotě 6 °C (simulace podmínek při NMR). Za stejných podmínek měření byl také otestován vzorek D zamražený na – 20 °C, jehož výsledek byl podobný

jako u předešlých třech vzorků. Koncentrace všech vzorků byla $6,7 \text{ mg ml}^{-1}$. Výsledný hydrodynamický poloměr proteinu obsaženého ve vzorku A byl $4,00 \pm 0,71 \text{ nm}$, ve vzorku B byl $3,93 \pm 0,56 \text{ nm}$, ve vzorku C byl $4,25 \pm 0,64 \text{ nm}$ a ve vzorku D byl $4,22 \pm 0,65 \text{ nm}$ (střední hodnota \pm s. d. z deseti měření). Obrázek 5.17 zobrazuje autokorelační funkce a distribuce hydrodynamických poloměrů všech měřených vzorků.

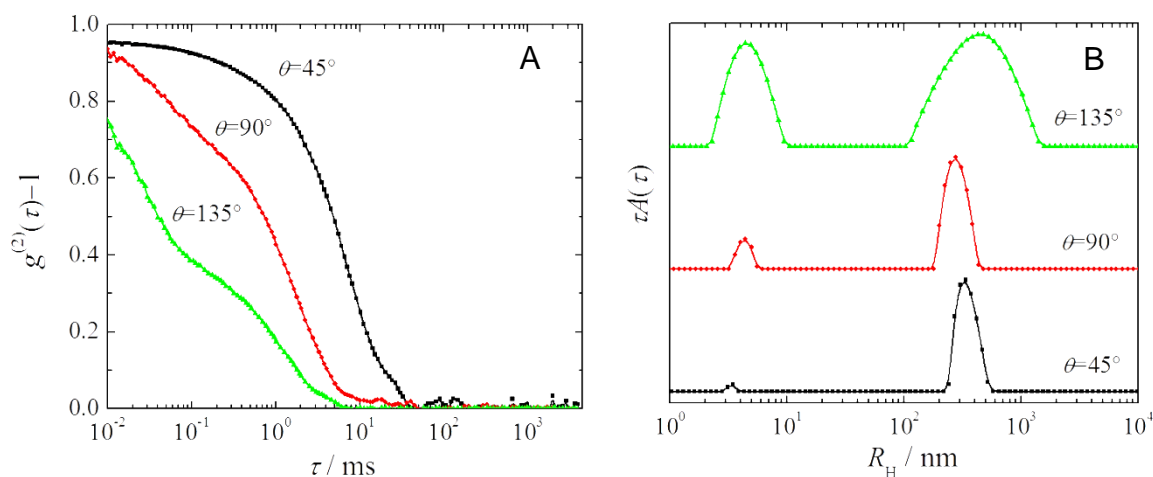


Obrázek 5.17: Výsledky měření dynamického rozptylu světla na přístroji Laser-Spectroscatter 201 ($\lambda = 532 \text{ nm}$, úhel 90° , teplota 20°C). A: vzorek inkubovaný při laboratorní teplotě, B: vzorek inkubovaný při teplotě 18°C , C: vzorek inkubovaný při teplotě 6°C , D: vzorek zamražený na -20°C . U každého vzorku je uvedena autokorelační funkce vypočtená z naměřených dat a výsledná distribuce hydrodynamických poloměrů.

Z dat získaných měření DLS na přístroji Laser-Spectroscatter 201 zobrazených na obrázku 5.17 na straně 54 je patrné, že distribuce hydrodynamických poloměrů vzorků A a B je velice podobná. Tyto vzorky na rozdíl od vzorků C a D navíc vykazovaly vyšší monodisperzitu.

b) Výsledky DLS měřeného na přístroji ALV

Pro získání kvalitnějších dat zejména přesnějšího hydrodynamického poloměru byl následně použit spektrofotometr AVL z Katedry fyzikální a makro-molekulární chemie UK. Zařízení pro měření rozptylu světla se skládalo z 22 mW He-Ne laseru pracujícího na vlnové délce $\lambda = 632,8$ nm, ALV CGS/8F automatické úhloměru, ALV High QE APD detektoru a ALV 5000/ELS multibit, multitau autokorelátoru. Měření bylo provedeno za teploty 25 °C a pod úhly rozptylu (θ) 45°, 90° a 135°. K měření byl použit připravený purifikací IV (viz strana 45), jehož přibližný objem byl 0,5 ml a jehož přibližná koncentrace byla 3,2 mg ml⁻¹. Byly sledovány časové fluktuace intenzity rozptýleného světla $I(t)$ a vyhodnoceny pomocí autokorelačních funkcí, které jsou zobrazeny na obrázku 5.18 A. Odpovídající distribuce R_H zobrazené na obrázku 5.18 B jsou bimodální.



Obrázek 5.18: A: Autokorelační funkce DLS intenzit roztoku proteinu měřené pod úhly rozptylu 45 °, 90 ° a 135 °. B: Distribuce hydrodynamických poloměrů vypočtené z $g^{(2)}(\tau)$ funkcí.

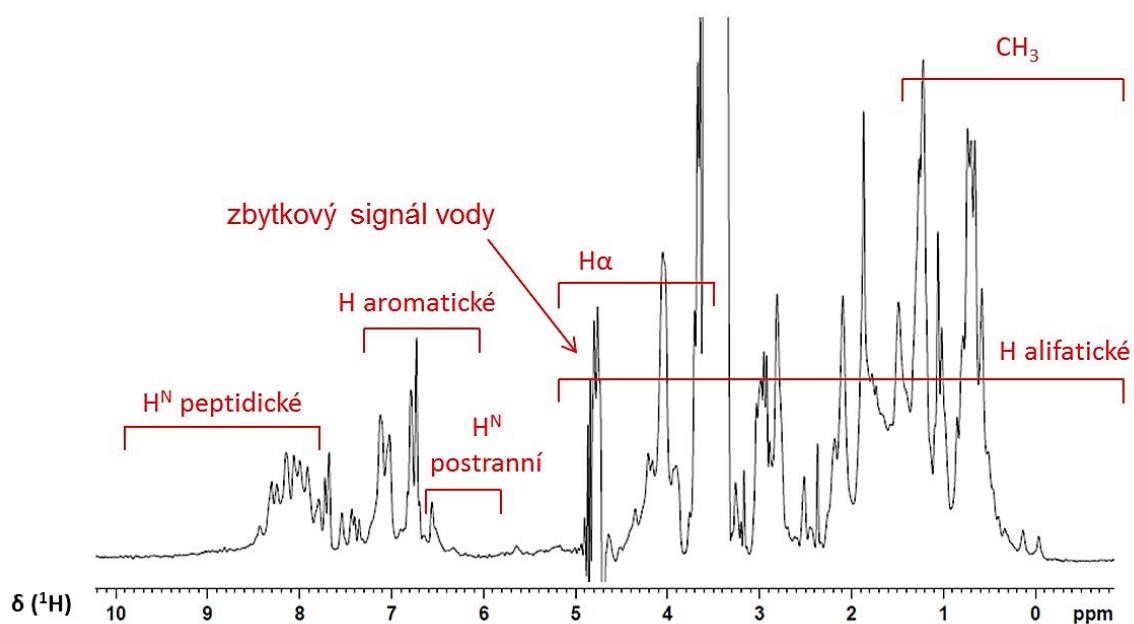
Úhlové závislosti střední doby relaxace obou forem (agregovaný a neagregovaný protein) odpovídají difuzním procesům. Proto jsou distribuce zobrazeny jako funkce hydrodynamických poloměrů. Relativní amplituda rychlejší formy (neagregovaný protein, difúze malých částic) se zvyšuje s rostoucím úhlem rozptylu. Takové chování je typické pro směsi rozptylujících částic, lišících se velikostí a je způsobeno tlumením rozptylu velkými částicemi při velkých θ způsobeným destruktivními mezičásticovými interferencemi. Přítomnost velkých částic (agregátů) naznačuje, že protein ve vodných roztocích prochází částečnou agregací. Je nutné si uvědomit, že distribuce hydrodynamických poloměrů jsou hodnoceny podle intenzity rozptylu (zvyšují se úměrně s šestou mocninou poloměru). Proto je příspěvek agregátů silně nadhodnocen a jejich hmotnostní zlomek ve vzorku je velmi nízký. Hydrodynamický poloměr proteinu TH1R byl vyhodnocen jako střední hodnota z rychlejšího módu na $\theta = 90^\circ$ a byla získána hodnota $4,28 \pm 0,04$ nm (střední hodnota \pm s. d. z pěti měření).

Výsledky měření dynamického rozptylu světla získané ze dvou rozdílných přístrojů si vzájemně odpovídaly (přístroj Laser-Spectroscatter 201: $R_H \sim 4,1$ nm; přístroj ALV: $R_H \sim 4,3$ nm).

5.6.2 Nukleární magnetická rezonance

Vzorek připravený v purifikaci III (viz strana 42) byl využit pro naměření jednodimenzionálního ^1H -NMR spektra, které je zobrazeno na obrázku 5.19 na straně 57. Tento vzorek obsahoval protein TH1R o výsledné koncentraci $2,7 \text{ mg ml}^{-1}$, který byl získán z 1/3 pelety z šesti litrů bakteriální kultury kultivované v LB-médiu. Protein TH1R byl rozpuštěn ve vodném (90% H_2O /10% D_2O) fosfátovém pufru, jehož pH bylo 7 a jehož koncentrace byla $20 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$. Měření probíhalo na NMR spektrometru Bruker Avance III s vodíkovou frekvencí 600 MHz za použití kryosondy optimalizované pro měření proteinových vzorků. Teplota měření byla 10°C . Potlačení signálu H_2O bylo provedeno metodou watergate.

Z šířky čar získaného ^1H -NMR spektra je možné usuzovat, že se protein nachází v neagregovaném stavu. Disperze peptidických vodíků navíc patrně potvrzuje, že protein TH1R je opravdu nestrukturní.



Obrázek 5.19: ^1H -NMR spektrum naměřené na vzorku získaném z purifikace III, jehož koncentrace byla $2,7 \text{ mg ml}^{-1}$ a který obsahoval protein TH1R (177 aminokyselin, relativní molekulová hmotnost 19 500) a 10% D_2O . Měření bylo provedeno na spektrometru Bruker Avance III s vodíkovou frekvencí 600 MHz za použití kryosondy při teplotě 10°C .

6 Diskuse

Enzym tyrosinhydroxylasa hraje klíčovou roli v prvním kroku biosyntézy katecholaminových neuropřenašečů [9, 10], z této skutečnosti plyne její důležitost a vliv na vznik neurologických onemocnění, například Parkinsonovy choroby [2]. Významnost tyrosinhydroxylasy se odráží i ve složitosti mechanismu regulace její aktivity [12]. Kontrola regulace je prováděna několika různými způsoby a jednou z možností jsou posttranslační modifikace regulační domény pomocí fosforylace [40].

Pro detailní pochopení funkce a regulace tyrosinhydroxylasy je důležité objasnit strukturu její regulační domény. Bylo dokázáno, že regulační doména lidské tyrosinhydroxylasy izoforma 1 (TH1R) je nestrukturní doménou s nízkým zastoupením sekundární struktury [5]. Na této skutečnosti není nic neobvyklého, protože velké množství dalších proteinů v živých organismech nemá také definovanou třídímenzionální strukturu a jejich struktura se pravděpodobně blíží struktuře náhodného klubka. Geny pro takovéto proteiny jsou v lidském i jiných genomech zastoupeny přirozeně, nejedná se tedy o žádnou anomálii [71]. Důvodem nestrukturního uspořádání jsou pravděpodobně protein-proteinové interakce vyžadující plasticitu a proměnlivost struktury vazebných proteinových partnerů. Tyto vlastnosti umožňují vytváření variabilních multi-proteinových komplexů různých bílkovin [72, 73].

Strukturu neuspořádaných částí proteinů je většinou nemožné studovat krystalograficky. Pokud vůbec dojde ke vzniku krystalu, nestrukturní části řetězce mohou být v krystalu nepřirozeně uspořádány díky intermolekulárním kontaktům krystalové mřížky nebo nemusejí být vůbec identifikovatelné pomocí difrakčních metod. NMR je jednou z mála metod použitelných pro studium konformace neuspořádaných proteinů [65]. Jedinečnost této metody spočívá i v možnosti měření v roztocích, které mohou dobře napodobit fyziologické podmínky v živých organismech. NMR měření tak poskytuje možnosti úpravy pH, teploty a koncentrace soli, tak aby co nejlépe odpovídaly vlastnostem prostředí, ve kterém se protein přirozeně vyskytuje [63].

Pro NMR měření je potřeba získat miligramové množství čistého, neagregovaného a stabilního proteinu. Pravděpodobnost agregace a degradace proteinu byla částečně snížena expresí proteinu TH1R při 20 °C po dobu dvanácti hodin (oproti běžným

37 °C), chlazením roztoku proteinu po celou dobu jeho purifikace, použitím detergentu NP-40 a inhibitoru proteas, odstraněním veškerého zmrazování a zkrácením doby potřebné k purifikaci. V rámci systematického předcházení podmínkám, při kterých by mohlo docházet k agregaci proteinu TH1R byly přizpůsobeny i první kroky purifikace, zejména objemy vzorků používané při niklové chelatační chromatografii. Právě zde docházelo ke zvýšení koncentrace proteinu v roztocích o malých objemech, což patrně způsobovalo vznik většího množství agregovaného proteinu TH1R. Pro odstranění agregovaného proteinu TH1R byla využívána gelová permeační chromatografie, při které byl agregovaný protein obsažen ve frakcích označených písmenem A. Tento předpoklad byl potvrzen několika DLS měřeními, která prokázala, že frakce označené písmenem B (tedy migrující pomaleji) opravdu obsahují neagregovaný protein. Pro ověřování velikosti proteinových vzorků nebylo v tomto případě možné využívat SDS-PAGE, protože zde se jevila velikost frakcí A a B stejná – relativní molekulová hmotnost vzorků odebraných z obou frakcí se pohybovala mezi 20 000 a 25 000. Tato skutečnost navíc neodpovídala ani skutečné relativní hmotnosti TH1R proteinu, která je 19 500, což je možné vysvětlit nestandardním chováním nestrukturovaného proteinu při SDS-PAGE a vlivem SDS detergentu, díky kterému zanikají nekovalentní interakce nutné ke vzniku agregátu.

Dalšími podmínkami pro NMR měření bylo použití vhodného pufru obsahujícího co nejnižší koncentraci soli. V našem případě byl použit fosfátový pufr o pH 7 obsahující NaCl výsledné koncentrace $0,3 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$.

Pro vyřešení struktury proteinu pomocí NMR bude nutné připravit rekombinantní protein 100% obohacený izotopy ^{15}N a ^{13}C . Pro tento účel se místo standardního LB-média používá tzv. médium minimální, které obsahuje jako jediný zdroj dusíku $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ a jako jediný zdroj uhlíku ^{13}C -glukosu. Toto médium je sestaveno pouze ze základních sloučenin, které bakterie *E. coli* potřebují ke svému růstu. Z tohoto důvodu dochází přibližně k 1,5× pomalejšímu růstu bakteriální kultury a podobně je tomu i s expresí proteinu TH1R – výtěžek je poměrně nízký, proto bude podle navrženého protokolu nutné připravovat vzorek pro NMR ne ze tří litrů bakteriální kultury, ale z šesti litrů, aby bylo dosaženo minimální měřitelné koncentrace $0,1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$.

V průběhu testování a optimalizace purifikačního protokolu jsme se také potýkali s nízkou čistotou proteinových frakcí eluovaných při niklové chelatační chromatografii. Tento problém byl částečně vyřešen zvýšením objemu pufru F používaného k oplachu při vsádkové metodě a také zvýšením obsahu imidazolu v tomto pufru. 15% (v/v) roztok pufru F v pufru E ve výsledku obsahoval imidazol o molární koncentraci $90 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ (oproti původní koncentraci $60 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) a jeho objem byl navýšen na 500 ml (z původních 300 ml). Těmito kroky došlo k lepšímu odstranění nespecificky navázaných proteinů, které bylo ale bohužel spojeno s nižším výtěžkem proteinu TH1R.

Výsledkem celého procesu testování a optimalizace jednotlivých kroků purifikačního protokolu je purifikace VI, při které bylo z šesti litrů bakteriální kultury kultivované v minimálním médiu získáno 2,6 mg proteinu TH1R. Výsledný vzorek obsahoval stabilní neagregovaný protein dostatečné čistoty a koncentrace, který byl vhodný pro případná měření pomocí NMR.

7 Závěr

Hlavní stanovený cíl této diplomové práce byl úspěšně splněn. Byl dokončen vývoj a optimalizace již dříve existujícího purifikačního protokolu regulační domény lidské tyrosinhydroxylasy (TH1R). Protokol je plně využitelný pro přípravu proteinu TH1R pro strukturní studie pomocí nukleární magnetické rezonance.

Všechny dílčí cíle byly splněny:

- Celkem čtyřikrát byla úspěšně provedena exprese proteinu lidské TH1R v bakteriích *Escherichia coli* kmen BL21 (DE3) na minimálním médiu, což dále umožňuje 100% izotopové obohacení proteinu.
- Bylo ukázáno, že TH1R je stabilní ve fosfátovém pufru obsahujícím NaCl o koncentraci $0,3 \text{ mol dm}^{-3}$ a že tento pufr je vhodný pro NMR měření.
- Byl optimalizován celý proces purifikace, zejména pak podmínky niklové chelatační chromatografie umožňující přípravu dostatečně čistého proteinu.
- Studium monodisperzity připraveného proteinu TH1R pomocí dynamického rozptylu světla a jednodimenzionálního ^1H -NMR spektra potvrdilo, že připravený protein není agregován.

Testovaný purifikační protokol tedy umožňuje přípravu miligramových množství čistého stabilního neagregovaného proteinu TH1R, který je vhodný pro další NMR měření.

8 Seznam citované literatury

1. Nagatsu, T.; Levitt, M.; Udenfriend, S.: Tyrosine hydroxylase. The initial step in norepinephrine biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* **239**, 2910–2917 (1964).
2. Haavik, J.; Toska, K.: Tyrosine hydroxylase and Parkinson's disease. *Molecular Neurobiology* **16**, 285–309 (1998).
3. Ichimura, T.; Isobe, T.; Okuyama, T.; Takahashi, N.; Araki, K.; Kuwano, R.; Takahashi, Y.: Molecular cloning of cDNA coding for brain-specific 14-3-3 protein, a protein kinase-dependent activator of tyrosine and tryptophan hydroxylases. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **85**, 7084–7088 (1988).
4. Aitken, A.: 14-3-3 and its possible role in co-ordinating multiple signalling pathways. *Trends in Cell Biology* **6**, 341–347 (1996).
5. Obsilova, V.; Nedbalkova, E.; Silhan, J.; Boura, E.; Herman, P.; Vecer, J.; Sulc, M.; Teisinger, J.; Dyda, F.; Obsil, T.: The 14-3-3 protein affects the conformation of the regulatory domain of human tyrosine hydroxylase. *Biochemistry* **47**, 1768–1777 (2008).
6. Kopecká, M.: *Studium struktury a funkce proteinů účastnících se přenosu signálu v buňce*. Bakalářská práce, Praha, PřF UK 2009.
7. Fitzpatrick, P. F.: Tetrahydropterin-dependent amino acid hydroxylases. *Annual Review of Biochemistry* **68**, 355–381 (1999).
8. Kuczenski, R. T.; Mandell, A. J.: Regulatory properties of soluble and particulate rat brain tyrosine hydroxylase. *Journal of Biological Chemistry* **247**, 3114–3122 (1972).
9. Goodwill, K. E.; Sabatier, C.; Marks, C.; Raag, R.; Fitzpatrick, P. F.; Stevens, R. C.: Crystal structure of tyrosine hydroxylase at 2.3 Å and its implications for inherited neurodegenerative diseases. *Nature Structural Biology* **4**, 578–585 (1997).
10. Flatmark, T.: Catecholamine biosynthesis and physiological regulation in neuroendocrine cells. *Acta Physiologica Scandinavica* **168**, 1–17 (2000).

11. Zigmond, R. E.; Schwarzschild, M. A.; Rittenhouse, A. R.: Acute regulation of tyrosine hydroxylase by nerve activity and by neurotransmitters via phosphorylation. *Annual Review of Neuroscience* **12**, 415–461 (1989).
12. Grima, B.; Lamouroux, A.; Boni, C.; Julien, J. F.; Javoy-Agid, F.; Mallet, J.: A single human gene encoding multiple tyrosine hydroxylases with different predicted functional characteristics. *Nature* **326**, 707–711 (1987).
13. Haavik, J.; Flatmark, T.: Isolation and characterization of tetrahydropterin oxidation products generated in the tyrosine 3-monooxygenase (tyrosine hydroxylase) reaction. *European Journal of Biochemistry* **168**, 21–26 (1987).
14. Fitzpatrick, P. F.: Mechanism of aromatic amino acid hydroxylation. *Biochemistry* **42**, 14083–14091 (2003).
15. Ledley, F. D.; DiLella, A. G.; Kwok, S. C.; Woo, S. L.: Homology between phenylalanine and tyrosine hydroxylases reveals common structural and functional domains. *Biochemistry* **24**, 3389–3394 (1985).
16. Grenett, H. E.; Ledley, F. D.; Reed, L. L.; Woo, S. L.: Full-length cDNA for rabbit tryptophan hydroxylase: functional domains and evolution of aromatic amino acid hydroxylases. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **84**, 5530–5534 (1987).
17. Lewis, D. A.; Melchitzky, D. S.; Haycock, J. W.: Four isoforms of tyrosine hydroxylase are expressed in human brain. *Neuroscience* **54**, 477–492 (1993).
18. Okuno, S.; Fujisawa, H.: Purification and some properties of tyrosine 3-monooxygenase from rat adrenal. *European Journal of Biochemistry* **122**, 49–55 (1982).
19. Daubner, S. C.; Lohse, D. L.; Fitzpatrick, P. F.: Expression and characterization of catalytic and regulatory domains of rat tyrosine hydroxylase. *Protein Science* **2**, 1452–1460 (1993).
20. Moran, G. R.; Daubner, S. C.; Fitzpatrick, P. F.: Expression and characterization of the catalytic core of tryptophan hydroxylase. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 12259–12266 (1998).

21. Lohse, D. L.; Fitzpatrick, P. F.: Identification of the intersubunit binding region in rat tyrosine hydroxylase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **197**, 1543–1548 (1993).
22. Kobe, B.; Jennings, I. G.; House, C. M.; Feil, S. C.; Michell, B. J.; Tiganis, T.; Parker, M.W.; Cotton, R. G.; Kemp, B. E.: Regulation and crystallization of phosphorylated and dephosphorylated forms of truncated dimeric phenylalanine hydroxylase. *Protein Science* **6**, 1352–1357 (1997).
23. Haavik, J.; Andersson, K.K.; Petersson, L.; Flatmark, T.: Soluble tyrosine hydroxylase (tyrosine 3-monooxygenase) from bovine adrenal medulla: large-scale purification and physicochemical properties. *Biochimica et Biophysica Acta* **953**, 142–156 (1988).
24. Haavik, J.; Le Bourdelles, B.; Martinez, A.; Flatmark, T.; Mallet, J.: Recombinant human tyrosine hydroxylase isozymes. Reconstitution with iron and inhibitory effect of other metal ions. *European Journal of Biochemistry* **199**, 371–378 (1991).
25. Fitzpatrick, P. F.: The metal requirement of rat tyrosine hydroxylase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **161**, 211–215 (1989).
26. Ramsey, A. J.; Hillas, P. J.; Fitzpatrick, P. F.: Characterization of the active site iron in tyrosine hydroxylase. Redox states of the iron. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 24395–24400 (1996).
27. Fitzpatrick, P. F.: Steady-state kinetic mechanism of rat tyrosine hydroxylase. *Biochemistry* **30**, 3658–3662 (1991).
28. Dix, T. A.; Bollag, G. E.; Domanico, P. L.; Benkovic, S. J.: Phenylalanine hydroxylase: absolute configuration and source of oxygen of the 4a-hydroxytetrahydropterin species. *Biochemistry* **24**, 2955–2958 (1985).
29. Kaufman, S.; Bridgers, W. F.; Eisenberg, F.; Friedman, S.: The source of oxygen in the phenylalanine hydroxylase and the copamine-beta-hydroxylase catalyzed reactions. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **9**, 497–502 (1962).

30. Fitzpatrick, P. F.; Ralph, E. C.; Ellis, H. R.; Willmon, O. J.; Daubner, S. C.: Characterization of metal ligand mutants of tyrosine hydroxylase: insights into the plasticity of a 2-histidine-1-carboxylate triad. *Biochemistry* **42**, 2081–2088 (2003).
31. Fukami, M. H.; Haavik, J.; Flatmark, T.: Phenylalanine as substrate for tyrosine hydroxylase in bovine adrenal chromaffin cells. *Biochemical Journal* **268**, 525–528 (1990).
32. Daubner, S. C.; Hillas, P. J.; Fitzpatrick, P. F.: Characterization of chimeric pterin-dependent hydroxylases: contributions of the regulatory domains of tyrosine and phenylalanine hydroxylase to substrate specificity. *Biochemistry* **36**, 11574–11582 (1997).
33. Daubner, S. C.; Moran, G. R.; Fitzpatrick, P. F.: Role of tryptophan hydroxylase phe313 in determining substrate specificity. *Biochemical and Biophysical Research* **292**, 639–641 (2002).
34. Fitzpatrick, P. F.: Mechanistic studies of tyrosine hydroxylase. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **338**, 81–86 (1993).
35. Ellenbogen, L.; Taylor, R. J.; Brundage, G. B.: On the role of pteridines as cofactors for tyrosine hydroxylase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **19**, 708–715 (1965).
36. Fujinaga, M.; Scott, J. C.: Gene expression of catecholamine synthesizing enzymes and beta adrenoceptor subtypes during rat embryogenesis. *Neuroscience Letters* **231**, stránky 108–112 (1997).
37. Kumer, S. C.; Vrana, K. E.: Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene expression. *Journal of Neurochemistry* **67**, 443–462 (1996).
38. Haycock, J. W.: Multiple signaling pathways in bovine chromaffin cells regulate tyrosine hydroxylase phosphorylation at Ser19, Ser31, and Ser40. *Neurochem. Res.* **18**, 15–26 (1993).
39. Campbell, D. G.; Hardie, D. G.; Vulliet, P. R.: Identification of four phosphorylation sites in the N-terminal region of tyrosine hydroxylase. *Journal of Biological Chemistry* **261**, 10489–10492 (1986).

40. Dunkley, P.R.; Bobrovskaya, L.; Graham, M. E.; von Nagy-Felsobuki, E. I.; Dickson, P. W.: Tyrosine hydroxylase phosphorylation: regulation and consequences. *Journal of Neurochemistry* **91**, 1025–1043 (2004).
41. Haycock, J. W.: Phosphorylation of tyrosine hydroxylase in situ at serine 8, 19, 31, and 40. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 11682–11691 (1990).
42. Ramsey, A.; Fitzpatrick, P. F.: Effects of phosphorylation of serine 40 of tyrosine hydroxylase on binding of catecholamines: evidence for a novel regulatory mechanism. *Biochemistry* **37**, 8980–8986 (1998).
43. Daubner, S. C.; Lauriano, C.; Haycock, J. W.; Fitzpatrick, P. F.: Site-directed mutagenesis of serine 40 of rat tyrosine hydroxylase. Effects of dopamine and cAMP-dependent phosphorylation on enzyme activity. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 12639–12646 (1992).
44. Ribbeiro, P.; Wang, Y.; Citro, B. A.; Kaufman, S.: Regulation of recombinant rat tyrosine hydroxylase by dopamine. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **89**, 9593–9597 (1992).
45. Wu, J.; Filer, D.; Friedhoff, A. J.; Goldstein, M.: Site-directed mutagenesis of tyrosine hydroxylase. Role of serine 40 in catalysis. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 25754–25758 (1992).
46. McCulloch, R. I.; Fitzpatrick, P. F.: Limited proteolysis of tyrosine hydroxylase identifies residues 33–50 as conformationally sensitive to phosphorylation state and dopamine binding. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **367**, 143–145 (1999).
47. Bevilaqua, L. R.; Graham, M. E.; Dunkley, P. R.; von Nagy-Felsobuki, E. I.; Dickson, P. W.: Phosphorylation of Ser(19) alters the conformation of tyrosine hydroxylase to increase the rate of phosphorylation of Ser(40). *Journal of Biological Chemistry* **276**, 40411–40416 (2001).
48. McCulloch, R. I.; Daubner, S. C.; Fitzpatrick, P. F.: Effects of substitution at serine 40 of tyrosine hydroxylase on catecholamine binding. *Biochemistry* **40**, 7273–7278 (2001).
49. Sura, G. R.; Daubner, S. C.; Fitzpatrick, P. F.: Effects of phosphorylation by protein kinase A on binding of catecholamines to the human tyrosine hydroxylase isoforms. *Journal of Neurochemistry* **90**, 970–978 (2004).

50. Sutherland, C.; Alterio, J.; Campbell, D. G.; Le Bourdellès, B.; Mallet, J.; Haavik, J.; Cohen, P.: Phosphorylation and activation of human tyrosine hydroxylase in vitro by mitogen-activated protein (MAP) kinase and MAP-kinase-activated kinases 1 and 2. *European Journal of Biochemistry* **217**, 715–722 (1993).
51. Fujisawa, H.; Okuno, S.: Regulatory mechanism of tyrosine hydroxylase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **338**, 271–276 (2005).
52. Funakoshi, H.; Okuno, S.; Fujisawa, H.: Different effects on activity caused by phosphorylation of tyrosine hydroxylase at serine 40 by three multifunctional protein kinases. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 15614–15620 (1991).
53. Alterio, J.; Ravassard, P.; Haavik, J.; Le Caer, J. P.; Biguet, N. F.; Waksman, G.; Mallet, J.: Human tyrosine hydroxylase isoforms. Inhibition by excess tetrahydropterin and unusual behavior of isoform 3 after camp-dependent. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 10196–10201 (1998).
54. Halloran, S. M.; Vulliet, P. R.: Microtubule-associated protein kinase-2 phosphorylates and activates tyrosine hydroxylase following depolarization of bovine adrenal chromaffin cells. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 30960–30965 (1994).
55. Okuno, S. a Fujisawa, H. A new mechanism for regulation of tyrosine 3-monooxygenase by end product and cyclic AMP-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* **260**, 2633–2635 (1985).
56. Ramsey, A. J.; Fitzpatrick, P. F.: Effects of phosphorylation of serine 40 of tyrosine hydroxylase on binding of catecholamines: evidence for a novel regulatory mechanism. *Biochemistry* **37**, 8980–8986 (1998).
57. Fu, H.; Subramanian, R. R.; Masters, S. C.: 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **40**, 617–647 (2000).
58. Muslin, A. J.; Tanner, J. W.; Allen, P. M.; Shaw, A. S.: Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell* **84**, 889–897 (1996).

59. Itagaki, C.; Isobe, T.; Taoka, M.; Natsume, T.; Nomura, N.; Horigome, T.; Omata, S.; Ichinose, H.; Nagatsu, T.; Greene, L. A.; Ichimura, T.: Stimulus-coupled interaction of tyrosine hydroxylase with 14-3-3 proteins. *Biochemistry* **38**, 15673–15680 (1999).
60. Royo, M.; Fitzpatrick, P. F.; Daubner, S. C.: Mutation of regulatory serines of rat tyrosine hydroxylase to glutamate: effects on enzyme stability and activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **434**, 266–274 (2005).
61. Toska, K.; Kleppe, R.; Armstrong, C. G.; Morrice, N. A.; Cohen, P.; Haavik, J.: Regulation of tyrosine hydroxylase by stress-activated protein kinases. *Journal of Neurochemistry* **83**, 775–783 (2002).
62. Obsilova, V.; Silhan, J.; Boura, E.; Teisinger, J.; Obsil, T.: 14-3-3 proteins: a family of versatile molecular regulators. *Physiological Research* **57**, 11–21 (2008).
63. Wüthrich, K.: *NMR of Proteins and Nucleic Acids*. New York, John Wiley and Sons, 1986.
64. Cavanah, J.; Fairbrother, W. J.; Palmer, A.G.; Skelton, N.J.: *Protein NMR Spectroscopy. Principles and Practice*. New York, Academic Press 1996.
65. Dyson, H. J.; Wright, P. E.: Unfolded proteins and protein folding studied by NMR. *Chemical Reviews* **104**, 3607–3622 (2004).
66. Bax, A.; Grzesiek, S.: Methodological Advances in Protein NMR. *Accounts. Chemical Research* **26**, 131–138 (1993).
67. Muchmore, D. C.; McIntosh, L. P.; Russell, C. B.; Anderson, D. E.; Dahlquist, F. W.: Expression and nitrogen-15 labeling of proteins for proton and nitrogen-15 nuclear magnetic resonance. *Methods in Enzymology* **177**, 44–73 (1989).
68. Zerbe, O.: *BioNMR in Drug Research*. Weinheim, Wiley-VCH 2002.
69. Ernst, R. R.; Bodenhausen, G.; Wokaun, A.: *Principles of NMR in One and Two Dimensions*. Oxford, Clarendon Press 1987.
70. Procházka, K.: *Fyzikální chemie polymerů*. Praha, Univerzita Karlova Praha 1995.
71. Fink, A.L.: Natively unfolded proteins. *Current Opinion in Structural Biology* **15**, 35–41 (2005).

72. Dyson, H. J.; Wright, P. E.: Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **6**, 197–208 (2005).
73. Oldfield, C. J.; Cheng, Y.; Cortese, M. S.; Brown, C. J.; Uversky, V. N.; Dunker, A. K.: Comparing and combining predictors of mostly disordered proteins. *Biochemistry* **44**, 1989–2000 (2005).

Internetové zdroje:

⟨1⟩ <<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>> [17.5.2011]